

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Vergleichende Analyse des Proteoms der Bursa  
Fabricii des Huhns zu verschiedenen  
Entwicklungszeitpunkten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Julia Katharina Korte  
aus  
Hannover

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. J. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. B. Kaspers
Korreferenten:	Priv.-Doz. Dr. M. Schneider Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer Univ.-Prof. Dr. R. T. Korbel Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

*Für Werner Korte*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Besonderheiten im Immunsystem des Haushuhns.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Die B-Zellentwicklung beim Haushuhn .....</b>	<b>4</b>
2.2.1. Aufbau und Entwicklung der Bursa Fabricii.....	4
2.2.2. Zeitlicher Ablauf der B-Zellentwicklung.....	6
2.2.3. Regulation der B-Zellentwicklung.....	11
<b>2.3. Proteomische Studien.....</b>	<b>12</b>
2.3.1. Proteomanalysen der B-Zelle .....	12
2.3.2. Proteomanalysen unterschiedlicher B-Zell-Entwicklungsstadien.....	13
2.3.3. Proteomanalysen der Bursa Fabricii .....	14
<b>3. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Tiere und Tierhaltung.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2. Probennahme .....</b>	<b>20</b>
4.2.1. Organentnahme der Bursa Fabricii .....	20
4.2.2. Präparation von bursalen B-Zellen.....	22
4.2.3. B-Zell-Separation mittels Magnetic Cell Sorting.....	23
<b>4.3. Probenvorbereitung .....</b>	<b>25</b>
4.3.1. Lyse der Bursaprobe.....	25
4.3.2. Quantifizierung der Proteinmenge mittels Bradford Assay .....	26
4.3.3. Lyse der B-Zellen.....	27
<b>4.4. Qualitative Analysen .....</b>	<b>27</b>
4.4.1. Vorfraktionierung der Proben mittels 1D-SDS-PAGE .....	27
4.4.2. Coomassie Färbung.....	30
4.4.3. In-Gel-Trypsinverdau.....	30
4.4.4. Liquid Chromatographie .....	32
4.4.5. Massenspektrometrie.....	33
4.4.6. Identifizierung der Proteine über „MASCOT Search“ .....	36
4.4.7. Datenauswertung mittels „Scaffold“-Analyse .....	38

---

4.4.8. Gene Ontology .....	39
<b>4.5. Quantitative Analysen.....</b>	<b>40</b>
4.5.1. Isoelektrische Fokussierung .....	40
4.5.2. 2D-Gelelektrophorese .....	43
4.5.3. Silberfärbung.....	46
4.5.4. Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen .....	47
4.5.5. Scannen der analytischen Gele.....	50
4.5.6. Auswertung der 2D-Gele mittels „DeCyder 7.0“ .....	50
4.5.7. Coomassie-Färbung.....	51
4.5.8. Ausstechen der 2D-Gelspots .....	52
4.5.9. Trypischer Verdau der 2D-Gelspots .....	53
4.5.10. Aufreinigung und Spotten der Peptide auf das MALDI-Target.....	54
4.5.11. Identifizierung der Proteine.....	56
4.5.12. Ermittlung von homologen Proteinen .....	59
4.5.13. Gene Ontology .....	59
4.5.14. Pathway-Analysen.....	59
<b>5. ERGEBNISSE .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1. Festlegung der Probenentnahmezeitpunkte .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2. Qualitative Proteomik.....</b>	<b>60</b>
5.2.1. B-Zell-Separation mittels Magnetic Cell Sorting.....	61
5.2.2. Identifizierung der Proteine.....	61
5.2.3. Spectral Counting .....	63
5.2.4. Gene Ontology .....	64
<b>5.3. Quantitative Proteomik .....</b>	<b>66</b>
5.3.1. Optimierung der isoelektrischen Fokussierung.....	66
5.3.2. Optimierung der 2D-Gelelektrophorese .....	69
5.3.3. Qualitätskontrolle der Bursapropen durch 2D-Silbergele.....	71
5.3.4. Fluoreszenzfarbstofftest / Same-Same-Experiment .....	73
5.3.5. Anfertigung der analytischen 2D-Gele .....	74
5.3.6. Auswertung der 2D-Gele mittels „DeCyder 7.0“ .....	75
5.3.7. Identifizierung der Proteine.....	80
5.3.8. Gene Ontology .....	82
5.3.9. Pathway-Analysen.....	83

---

5.4.	Vergleich gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten .....	86
6.	DISKUSSION .....	90
6.1.	Einführung.....	90
6.2.	Auswahl der proteomischen Analyseverfahren.....	90
6.2.1.	2D-DIGE .....	91
6.2.2.	LC-MS/MS.....	94
6.3.	Grenzen der gewählten Analyseverfahren.....	95
6.4.	Betrachtung der Ergebnisse .....	97
6.4.1.	Festlegung der Probenentnahmezeitpunkte.....	97
6.4.2.	Qualitative Proteomik .....	97
6.4.3.	Quantitative Proteomik .....	99
6.4.4.	Vergleich gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten.....	103
6.5.	Kandidatenselektion.....	104
6.5.1.	Vinculin.....	104
6.5.2.	Gelsolin .....	106
6.5.3.	Proteine des Retinolsäure-Metabolismus .....	108
6.6.	Ausblick.....	111
7.	ZUSAMMENFASSUNG .....	112
8.	SUMMARY.....	114
9.	LITERATURVERZEICHNIS .....	116
10.	ANHANG .....	127
11.	DANKSAGUNG .....	134

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1 Aufbau der Bursa Fabricii .....	5
Abb. 2 Bursa-Entwicklung – Histologie .....	6
Abb. 3 Schema der B-Zell-Entwicklung beim Haushuhn.....	6
Abb. 4 Programmierter Zelltod und Zell-Überleben in der Bursa .....	16
Abb. 5 Organentnahme an ET18.....	22
Abb. 6 Ausschneiden der Proteinbanden.....	31
Abb. 7 Elektrospray-Ionisierung .....	34
Abb. 8 MS-Spektrum .....	35
Abb. 9 Peptidfragmentierung bei der MS-MS-Analyse.....	35
Abb. 10 Fluoreszenzmarkierung und 2D-DIGE .....	47
Abb. 11 Minimal Labeling .....	48
Abb. 12 MALDI-Ionisierung .....	55
Abb. 13 Schema des 4800 MALDI-TOF/TOF-Gerätes.....	57
Abb. 14 Zeitpunkte der Probenentnahme.....	60
Abb. 15 Aufreinigung der B-Zellen mittels MACS .....	61
Abb. 16 Vergleich der Proteome der bursalen Entwicklungsstadien sowie der B-Zellen .....	62
Abb. 17 Gene Ontology: Zellulärer Bestandteil.....	64
Abb. 18 Gene Ontology: Biologische Prozesse .....	65
Abb. 19 IEF - Vorversuche zu Proteinmenge, Probenvolumen und Spannung.....	67
Abb. 20 IEF – Vorversuch zu Cup-Loading versus Protein-Einquell-Methode .....	68
Abb. 21 2D-Gele - Vorversuche zu Polymerisation und Überschichtungstechnik.....	70
Abb. 22 2D-Silbergele.....	71
Abb. 23 Same-Same-Experiment.....	73
Abb. 24 2D-DIGE-Gele .....	75
Abb. 25 Principal Component Analysis.....	76
Abb. 26 Heatmap.....	77
Abb. 27 Expressionsprofile differentiell abundanter Protein-Spots.....	79
Abb. 28 Präparatives 2D-Gel .....	80
Abb. 29 Gene Ontology: Zellulärer Bestandteil bei differentiellen Proteinen.....	82
Abb. 30 Pathway für die Regulation des Aktin-Zytoskeletts.....	85
Abb. 31 Vergleich von Verlaufsprofilen gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten .....	88
Abb. 32 Autokrine und parakrine Wirkung von Retinolsäure .....	108

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1 Rezeptor-Liganden-Paare in der Bursa Fabricii.....	17
Tab. 2 Berechnung der benötigten Anzahl an Eiern .....	20
Tab. 3 Suchparameter “MASCOT Search”.....	37
Tab. 4 Grenzwerte “Scaffold”-Analyse .....	38
Tab. 5 Programm isoelektrische Fokussierung .....	42
Tab. 6 Programm 2D-Gelelektrophorese .....	46
Tab. 7 Planung DIGE-Experiment .....	49
Tab. 8 Parameter für Spot-Detektion (DIA).....	51
Tab. 9 Statistische Parameter (BVA) .....	51
Tab. 10 Statistische Parameter (EDA) .....	51
Tab. 11 IEF – Vorversuch zu Cup-Loading versus Protein-Einquell-Methode.....	69
Tab. 12 Optimierte Bedingungen für die isoelektrische Fokussierung.....	71
Tab. 13 Optimierte Bedingungen für die 2D-Gelelektrophorese.....	71
Tab. 14 Differentiell abundante Proteine .....	78
Tab. 15 Gruppenvergleich ET10 und ET18 .....	81
Tab. 16 Gruppenvergleich ET18 und Tag 2.....	82
Tab. 17 Gruppenvergleich Tag 2 und Tag 28 .....	82
Tab. 18 Übersicht über Pathways mit angereicherten differentiellen Proteinen.....	83
Tab. 19 Angereicherte diff. Proteine im Pathway „Regulation des Aktin-Zytoskeletts“ .....	83
Tab. 20 Vergleich der Verlaufsformen gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten ....	87



---

**DATEIVERZEICHNIS AUF CD-ROM**

Abb. CD1	Auswahl der 2D-DIGE-Gele
Tab. CD1	Gesamtübersicht Proteine aus 4 Entwicklungszeitpunkten
Tab. CD2	Gesamtübersicht Proteine aus B-Zellen
Tab. CD3	Spectral Count
Tab. CD4	Gene Ontology Qualitative Proteine – Zellteilung
Tab. CD5	Gene Ontology Qualitative Proteine – Zellwachstum
Tab. CD6	Gene Ontology Qualitative Proteine – Zelltod
Tab. CD7	Gene Ontology Qualitative Proteine – Zelladhäsion
Tab. CD8	Gene Ontology Qualitative Proteine – Zellmigration
Tab. CD9	Gene Ontology Qualitative Proteine – Immunsystem
Tab. CD10	Identifizierte differentielle Proteine
Tab. CD11	Mehrfach identifizierte Proteine
Tab. CD12	Differentielle Proteine Group-to-Group Comparison
Tab. CD13	Gene Ontology Differentielle Proteine – Zellteilung
Tab. CD14	Gene Ontology Differentielle Proteine – Zellwachstum
Tab. CD15	Gene Ontology Differentielle Proteine – Zelltod
Tab. CD16	Gene Ontology Differentielle Proteine – Zelladhäsion
Tab. CD17	Gene Ontology Differentielle Proteine – Zellmigration
Tab. CD18	Gene Ontology Differentielle Proteine – Immunsystem
Tab. CD19	Gene Ontology Differentielle Proteine – Membranproteine
Tab. CD20	Vergleich gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

2D-DIGE	engl.: Two-dimensional difference gel electrophoresis; zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
2D-PAGE	engl.: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D
ACN	Acetonitril
ADAMTS-5	engl.: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5
ALDH1A1 (RALDH1)	Retinaldehydrogenase 1
ALDH1A2 (RALDH2)	Retinaldehydrogenase 2
ALDH1A3 (RALDH3)	Retinaldehydrogenase 3
APRIL	engl.: A proliferation inducing ligand
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BAFF	engl.: B cell activating factor belonging to the TNF family
BALT	engl.: Bronchus associated lymphoid tissue; Bronchus assoziiertes lymphatisches Gewebe
Bcl-2	engl.: B-cell lymphoma 2
BSA	Bovines Serumalbumin
BSDZ	Bursale sekretorische dendritische Zellen
BVA	engl.: Biological Variation Analysis; Biologische Varianzanalyse
CALT	engl.: Conjunctiva associated lymphoid tissue; Konjunktiva assoziiertes lymphatisches Gewebe
CD	engl.: Cluster of differentiation
CD-ROM	engl.: Compact disc-read only memory
ch	engl.: chicken; Hühner-
CHAPS	3- 3-Cholamidopropyl-dimethyl-ammonium-1-propansulfonat
CID	engl.: Collision induced dissociation; Kollisions-induzierte Dissoziation
ConA	Concanavalin A
CRABP2	engl.: Cellular retinoic acid-binding protein 2
CSF	engl.: Colony-stimulating factor
CXCL13	engl.: C-X-C motif chemokine 13
CyDye	engl.: Cyanine dye
DDF	engl.: Differential detergent fractionation; differentielle Detergenzfraktionierung
DIA	engl.: Differential In-Gel Analysis; Differentielle In-Gel-Analyse
DMF	N-N-Dimethylformamid
DNA	engl.: Deoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure
DR	engl.: Death receptors; Todesrezeptoren
DTE	Dithioerythrit
EDA	engl.: Extended Data Analysis, Statistische Datenanalyse
ERZ	Epitheliale retikuläre Zellen

---

ESI	Elektrospray Ionisierung
ET	Embryonaltag
FA	engl.: Formic acid; Ameisensäure
FABP	engl.: Fatty acid binding proteins; Fettsäure-bindende Proteine
FABP5	engl.: Fatty acid-binding protein 5
FACS	engl.: Fluorescence activated cell sorting
FAE	Follikel assoziiertes Epithel
FAE-SC	engl.: FAE-supportive cells; das FAE unterstützende Zellen
FCS	engl.: Fetal calf serum; fetales Kälberserum
FDR	engl.: False discovery rate; Rate möglicher falsch positiver Identifizierungen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GALT	engl.: Gut associated lymphoid tissue; Darm assoziiertes lymphatisches Gewebe
Gly	Glycin
GRB2	engl.: Growth factor receptor-bound protein 2
HCl	engl.: Hydrochloric acid; Salzsäure
HDL	engl.: High density lipoprotein
His	Histidin
HPLC	engl.: High performance liquid chromatography; Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HSP	engl.: Heat shock protein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFE	Interfollikuläres Epithel
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPi	engl.: International Protein Index
IPS	Internal Pooled Standard
iTRAQ	engl.: isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation
JA	Jodacetamid
KEGG	engl.: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC	engl.: Liquid chromatography; Flüssigchromatographie
LCK	engl.: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LSL	engl.: Lohmann Selected Leghorn
Lys	Lysin
MACS	engl.: Magnetic Cell Sorting; magnetische Zellseparation
MALDI	Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisation
MAPK	engl.: Mitogen-activated protein kinase
MHC	engl.: Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	engl.: Messenger RNA
MRZ	Mesenchymale retikuläre Zellen
MS	Massenspektrometrie
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Ammoniumhydrogencarbonat
Pax 5	engl.: Paired box protein 5
PBS	engl.: Phosphate buffered saline; Phosphat gepufferte Salzlösung

---

PCA	engl.: Principal Component Analysis; Hauptkomponentenanalyse
PCD	engl.: Programmed cell death; programmierter Zelltod
pH	potentia Hydrogenii
PPAR	engl.: Peroxisome proliferator activated receptors
PS	Penicillin-Streptomycin
p-Wert	von engl.: probability; Wahrscheinlichkeitswert
RAR	engl.: Retinoic acid receptors; Retinolsäure-Rezeptoren
RBP-4	engl.: Retinol-binding protein 4
RBP-5	engl.: Retinol-binding protein 5
RNA	engl.: Ribonucleic Acid; Ribonucleinsäure
rpm	engl.: rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
RPMI	ebgl.: Rosewell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RSS	engl.: Recombinatorial signal sequences
RT	Raumtemperatur
SDS	engl.: Sodium dodecyl sulphate; Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sIgM	engl.: surface IgM, Oberflächen-IgM
SILAC	engl.: Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture
siRNA	engl.: Small interfering RNA
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TGF- $\beta$	engl.: Transforming growth factor- $\beta$
TIF	engl.: Tagged Image File Format
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TOF	engl.: Time of Flight; Flugzeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTR	Transthyretin
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. EINLEITUNG

Das Haushuhn ist heute nicht nur eine der weltweit bedeutendsten Nutztierspezies sondern auch ein seit über 50 Jahren etabliertes Modelltier für wissenschaftliche Studien, insbesondere solche immunologischer Art. So wurde beispielsweise die Dichotomie der Zellen der adaptiven Immunantwort, also die Einteilung dieser Zellen in Antikörper produzierende B-Zellen einerseits und zytotoxische T-Zellen sowie T-Helferzellen andererseits, zunächst im Huhn beschrieben [1]. Der Bursa Fabricii, einer dorsalen Ausstülpung der Kloake, kommt dabei als einzigartigem primär-lymphatischen Organ beim Vogel besondere Bedeutung zu. Im Gegensatz zur Situation beim Säuger, wo die Reifung der B-Zellen im Knochenmark stattfindet, sind essentielle Schritte der B-Zellentwicklung beim Vogel an einen Aufenthalt dieser Zellen in der Bursa Fabricii gekoppelt. So wandern präbursale Stammzellen aus Knochenmark, Dottersack und Milz zwischen dem siebten und vierzehnten Embryonaltag in die Bursaanlage ein, wo sie zu maturen B-Zellen heranreifen und durch Diversifikation ihres B-Zellrezeptors verschiedene Antigenspezifitäten ausbilden. Dabei exprimiert jede Zelle einen unterschiedlichen B-Zell- oder Immunglobulin-Rezeptor zur Erkennung eines spezifischen Antigens. Über die große Variabilität der verschiedenen Immunglobulin-Rezeptoren innerhalb der Gesamtpopulation der B-Zellen wird gewährleistet, dass das Immunsystem gegen eine Vielzahl an Antigenen gewappnet ist. Noch in der Bursa Fabricii proliferieren ausgewählte B-Zellen mit einem funktionellen Immunglobulin-Rezeptor während andere in Apoptose gehen. Um den Zeitpunkt des Schlupfes beginnt die Emigration der reifen, jedoch naiven B-Zellen aus der Bursa in Blutsystem und periphere lymphatische Organe. Während sich die Bursa Fabricii im Alter von ca. sechs Monaten zurückbildet, wird ein peripherer Pool an bursalen Stammzellen aufrecht erhalten, aus denen im Falle einer Infektion jederzeit Abwehrzellen für das entsprechende Antigen generiert werden können.

Die zeitliche Einordnung dieser Phasen der B-Zellentwicklung innerhalb der Embryonalentwicklung, sowie die molekularen Vorgänge der B-Zellrezeptor-Diversifizierung beim Huhn sind mittlerweile beschrieben. Wenig bekannt ist jedoch über mögliche regulatorische Faktoren, welche B-Zelleinwanderung, -reifung, und -emigration steuern könnten. Ebenso ist bisher unklar, welche Faktoren Einfluß auf die Entscheidung über Proliferation oder Apoptose und damit das Schicksal der individuellen B-Zelle haben.

Zur Untersuchung solcher Fragestellungen bietet neben transkriptomischen Methoden die moderne Proteomik mit Techniken wie der 2D-Gelelektrophorese und massenspektrometrischen Analysen hervorragende holistische Ansätze. Hierbei können

---

innerhalb eines definierten Gewebes Veränderungen auf Proteinebene zu festgelegten Entwicklungszeitpunkten untersucht werden. Diese Methoden eröffnen weitreichende Möglichkeiten wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns auf molekularer Ebene, die seit Veröffentlichung der Hühner-Genomsequenz durch das „International Chicken Genome Sequencing Committee“ 2005 auch speziell für das Huhn nutzbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl qualitative als auch quantitative Proteinanalysen der Bursa Fabricii des Huhns durchgeführt, um molekulare proteomische Veränderungen während der bursalen B-Zellentwicklung zu charakterisieren.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Besonderheiten im Immunsystem des Haushuhns

Das Immunsystem des Haushuhns gliedert sich wie das aller Vertebraten in einen angeborenen und einen erworbenen oder adaptiven Anteil. Während das angeborene Immunsystem des Huhns in weiten Teilen mit den vom Säuger bekannten Dogmen übereinstimmt, weist das adaptive Immunsystem beträchtliche strukturelle und funktionelle Unterschiede auf.

Anatomisch betrachtet erfolgt beim Huhn wie auch bei den Säugetieren eine Untergliederung in primäre und sekundäre lymphatische Organe. Zu den primären lymphatischen Organen zählen der Thymus, in dem die T-Zellentwicklung abläuft und die Bursa Fabricii als Organ der B-Zellreifung. Während Lymphknoten beim Huhn fehlen, sind die peripheren lymphatischen Organe dieser Spezies einerseits durch die Milz [2] und andererseits durch lymphatische Gewebsaggregate vertreten, welche nach ihrem Vorkommen in den unterschiedlichen Geweben klassifiziert sind. Im Bereich des Gastrointestinaltraktes findet sich das so genannte GALT („gut associated lymphoid tissue“), bestehend aus Ösophagaltonsille [3], den Caecaltonsillen, den Peyer'schen Platten [4], dem Meckel'schem Divertikel [5] und der Bursa [6]. In der Lunge befindet sich das BALT („bronchus associated lymphoid tissue“) [7] und im paransalen Bereich das CALT („conjunctiva associated lymphoid tissue“) [8] bestehend aus Lymphgewebsansammlungen im unteren Augenlid sowie der Harder'schen Drüse im Tränenkanal [9].

Während die T-Zellentwicklung große Ähnlichkeit zur Situation im Säuger aufweist, finden sich funktionelle Unterschiede v.a. in den Vorgängen der B-Zellreifung und –differenzierung. Bei Mensch und Maus findet die B-Zellentwicklung als lebenslanger Prozess im Knochenmark statt [10]. Das Ziel dabei ist, ein möglichst großes Repertoire an unterschiedlichen B-Zellrezeptoren zu generieren, um die Detektion und nachfolgende Elimination einer Vielzahl an Antigenen zu gewährleisten. Der Mechanismus, welcher dabei im Säuger zum Einsatz kommt ist die V-D-J-Rekombination, wobei V für den variablen Teil des Antigenrezeptors steht, D für ein Diversity- und J für ein Joining-Segment [11]. Da den meisten Säugern eine Vielzahl an unterschiedlichen V-Genen für die Rekombination zur Verfügung steht (beim Menschen sind es beispielsweise 65) und ebenso D- und J-Segmente mehrfach im Genom vertreten sind, wird durch die Rekombination sowie durch unterschiedliche Kombination der schweren Ketten mit den beiden leichten Ketten (siehe 2.2.2) eine ausreichende Rezeptordiversifität erreicht. Im

Gegensatz dazu ist diese Phase der B-Zellentwicklung beim Huhn ein auf wenige Tage in der Embryonalentwicklung begrenzter Prozess. Da das Huhn über nur je ein funktionelles V-Gen für die schwere und die leichte Kette verfügt, ist nur eine sehr limitierte V-D-J-Rekombination in Dottersack, Leber, Knochenmark und Milz möglich. Dementsprechend wird allein durch V-D-J-Rekombination beim Huhn kein breites Antigenrezeptorrepertoire erreicht [12]. Da ein solches jedoch für eine funktionierende Immunabwehr unabdingbar ist und auch das Huhn durchaus eine Vielzahl unterschiedlicher Immunglobulinrezeptoren besitzt, muss dieses auf andere Art generiert werden. Der hierfür beim Huhn hauptverantwortliche Mechanismus ist die Gene Conversion [13], ein Prozess bei dem einzelne Nukleotidsequenzen aus so genannten Pseudogenen in die funktionellen Gene für den B-Zellrezeptor übertragen werden (siehe 2.2.2). Diese Entwicklung findet beim Huhn in der zu den darmassoziierten lymphatischen Geweben gehörenden Bursa Fabricii statt. Auch andere Tierarten generieren ihr Antigenrepertoire zumindest teilweise über Gene Conversion in GALT-Gewebe, wie beispielsweise Rind [14-15], Schaf, [16] und Schwein [17] in den Peyers Patches des Darms, oder das Kaninchen im Blinddarm [18-19]. Somit stellt das Huhn keine Ausnahme unter den domestizierten Tierarten dar, sondern ist vielmehr als ein Modell für die B-Zellentwicklung vieler unserer Haustierspezies zu betrachten.

## **2.2. Die B-Zellentwicklung beim Haushuhn**

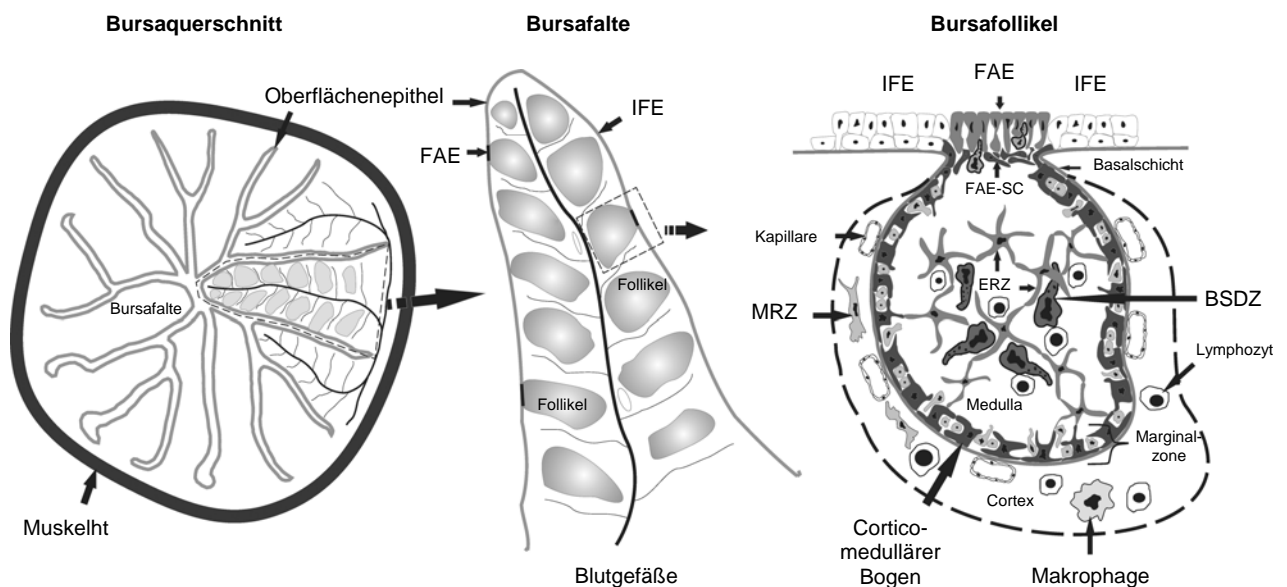
### **2.2.1. Aufbau und Entwicklung der Bursa Fabricii**

Die Bursa Fabricii ist ein ungefähr haselnußgroßes Darmanhangsorgan, gebildet durch eine sackartige Ausstülpung des dorsalen Proktodeums. Sie besteht aus einem von Primär- und Sekundärfalten umgebenen Hohlraum, der über einen Verbindungsgang, den so genannten Bursastiel, mit dem darunterliegenden Darmabschnitt verbunden ist [20]. Um das Organ liegt eine muskuläre Schicht deren Kontraktion den Hohlraum fast vollständig verengen kann und zur Leerung der bursalen Lymphgefäße beiträgt. Die Bursafalten bestehen aus Stromazellen, welche sich um die die B-Zellen enthaltenden Bursafollikel schließen und sind mit Säulenepithel bedeckt. In jeder Falte liegen zwei Reihen an Bursafollikeln, welche durch axiale Blut- und Lymphgefäße voneinander getrennt werden (siehe Abb. 1). Um den Zeitpunkt des Schlupfes enthält die Bursa ca. 10.000 Follikel, welche aus einem dem Endoderm entstammenden Cortex und einer Medulla mesodermalen Ursprungs bestehen. Die Follikelrinde enthält neben einer dicht gepackten Lymphozytenpopulation auch mesenchymale retikuläre Zellen (MRZ), während das Follikelmark neben epithelialen retikulären Zellen (ERZ) und Lymphozyten weiterhin Makrophagen und bursale sekretorische dendritische Zellen (BSDZ)



enthält [21]. Zwischen diesen beiden Anteilen liegt als cortico-medulläre Grenze die Lamina basalis. Das Epithel der Bursafalten gliedert sich in das Epithel über den Bursafollikeln, das so genannte Follikel assoziierte Epithel (FAE) [22], welches einen Anteil von 10 % einnimmt und der Absorption von Partikeln aus dem Bursalumen dient, sowie das dazwischen liegende interfollikuläre Epithel (IFE) [23], welches ca. 90 % des Epithels ausmacht. Unter dem Follikel assoziiertem Epithel fehlt die Basalschicht, statt dessen befinden sich hier zwei bis drei Lagen an unterstützenden Epithelzellen, den so genannten FAE-supportive cells (FAE-SC) [21].

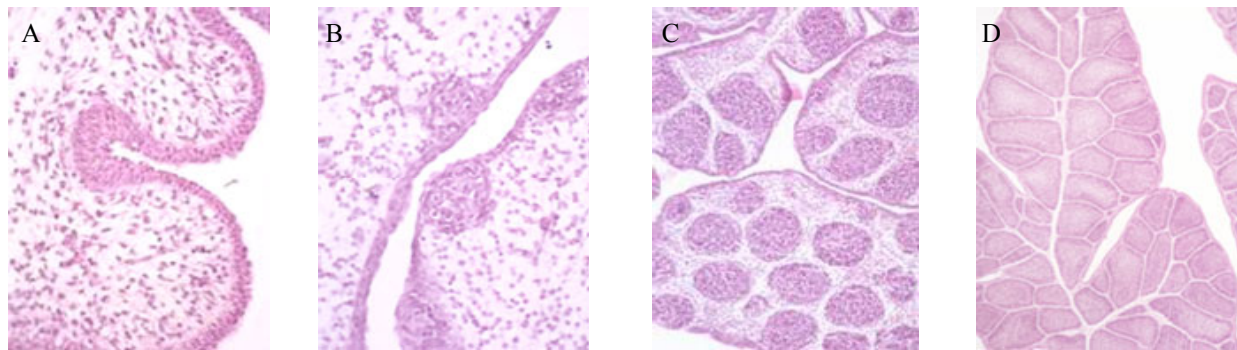
**Abb. 1 Aufbau der Bursa fabricii (nach Davison, Schat und Kaspers [21])**



Die Bursa Fabricii bildet sich am vierten Tag der embryonalen Entwicklung als eine aus endodermalen und mesenchymalen Anteilen bestehende Austülpung des Enddarms. Nach Einwanderung von B-Zell-Vorläufern aus Knochenmark, Blut und Milz ab dem 8. Embryonaltag (ET) beginnt die Ausbildung der Bursafollikel (siehe Abb.2) und die Bursa wächst durch klonale Expansion der B-Zellen bis sie ca. zwei bis vier Wochen nach dem Schlupf ihre volle Größe erreicht hat. Um den Zeitpunkt des Schlupfes beginnt auch die Strukturierung der Bursafollikel in Rinde und Mark. Mit Eintritt der sexuellen Reife im Alter von 4-6 Monaten kommt es dann zur Involution der Bursa und somit zum Verlust der Funktion als primär-lymphatisches Organ [24].

**Abb. 2 Bursa-Entwicklung – Histologie**

A: Besiedelung der Bursa mit ersten B-Zellen; B: Formation erster B-Zellfollikel entlang des Säulenepithels; C: homogen erscheinende B-Zellfollikel; D: ausgereifte B-Zellfollikel mit Trennung in Rinde und Mark



Bursa ET10

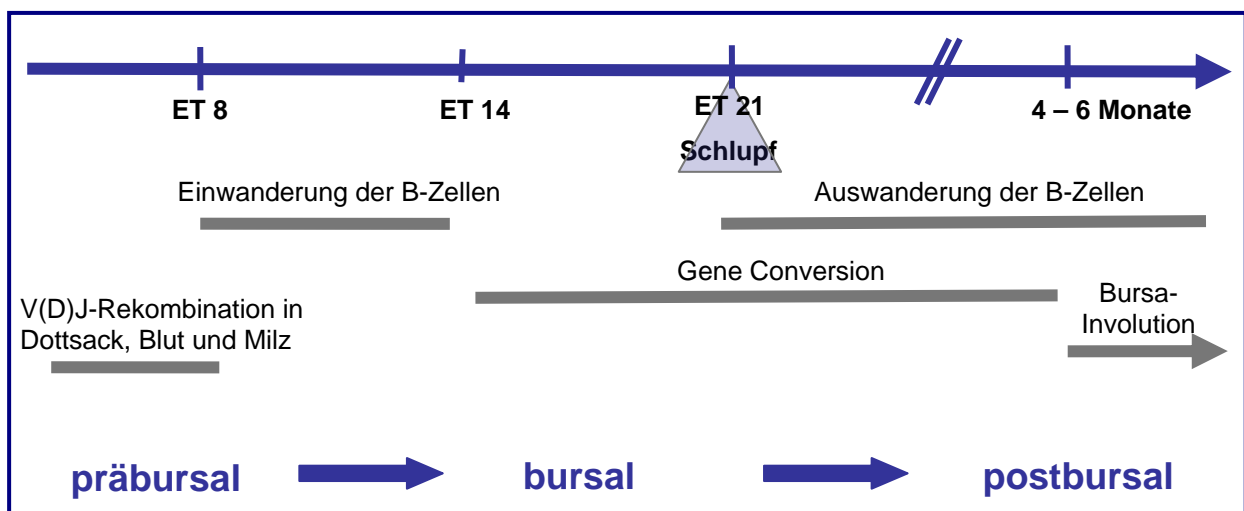
Bursa ET14

Bursa ET18

Bursa 4 Wochen

**2.2.2. Zeitlicher Ablauf der B-Zellentwicklung**

Die B-Zellentwicklung beim Haushuhn wird in drei Phasen gegliedert, eine präbursale, eine bursale und eine postbursale Entwicklungsphase [25] (siehe Abb. 3). In der präbursalen Phase findet ab dem fünften Embryonaltag die V-D-J-Rekombination des Immunglobulinrezeptors der B-Vorläuferzellen statt, anschließend wandern diese präbursalen Stammzellen zwischen ET 8 und ET14 in die Bursaanlage ein. In der bursalen Entwicklungsphase erfolgt dann die Diversifizierung des B-Zellrezeptors durch Gene Conversion und die reifen, jedoch naiven B-Zellen beginnen um den Zeitpunkt des Schlupfes aus der Bursa zu emigrieren. In der postbursalen Phase schließlich besiedeln die B-Zellen die peripheren lymphatischen Organe. Nach Involution der Bursa in einem Alter von vier bis sechs Monaten und damit des Verlusts der Möglichkeit der B-Zellreifung und Diversifizierung in diesem einzigartigen primär-lymphatischen Organ beim Vogel wird vermutlich ein kleiner Pool aus sich lebenslang erneuernden postbursalen Stammzellen aufrechterhalten, aus welchen sich die zur Immunabwehr benötigten B-Zellen rekrutieren [26].

**Abb. 3 Schema der B-Zell-Entwicklung beim Haushuhn**

### 2.2.2.1. Präbursale Phase

Während der präbursalen Phase werden hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem intraembryonalen Mesenchym auf die B-Zelllinie festgelegt [27] und kolonisieren die Bursa-Anlage. Diese Festlegung auf die B-Zelllinie manifestiert sich in der V-D-J-Rekombination der Immunglobulin-Gene während eines Zeitfensters von ca. 10 Tagen und findet initial im embryonalen Dottersack, später auch in Blut, Milz, Leber und Knochenmark statt [12]. Bereits zwischen dem 10. und 15. Embryonaltag kann Immunglobulin, sogenanntes surface Ig oder sIg, auf der B-Zelloberfläche nachgewiesen werden [28]. Jedes Immunglobulin-Molekül besteht aus zwei identischen schweren Ketten (heavy chains, H) und zwei identischen leichten Ketten (light chains, L), die durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Ypsilon-förmigen Struktur miteinander verknüpft sind. Der Mensch besitzt zwei Varianten für die leichte Kette,  $\kappa$  und  $\lambda$ , und eine Variante für die schwere Kette, während beim Huhn nur jeweils eine schwere und eine  $\lambda$ -ähnliche leichte Kette vorkommen [29]. Beide Ketten gliedern sich in einen variablen Teil oder die V-Region, welche der Erkennung spezifischer Antigene dient, und die konstante oder C-Region, welche beim sezernierten Molekül für die Vermittlung der Funktion an die Effektorzellen sorgt. Die V-Region gliedert sich weiter in ein variables oder V-Segment, welches den Kontakt mit dem Antigen vermittelt, ein Verbindungselement zum C-Teil, das so genannte J oder Joining-Segment und bei der schweren Kette zusätzlich noch ein D oder Diversity-Segment [30]. Bei der somatischen Rekombination, auch Gene Rearrangement genannt, werden die Gene für die einzelnen Teile des B-Zellrezeptors per Zufall aneinandergefügt, wobei die einzelnen Gensegmente nur in einem Drittel aller Fälle zu einem für die Transkription lesbaren DNA-Strang verknüpft werden [31]. Die dabei entstehende Diversifität des Immunglobulin-Rezeptors wird auch als „combinatorial diversity“ bezeichnet. Zusätzliche Diversifität wird bei Mensch und Maus durch Insertionen oder Deletionen einzelner Basen beim Zusammenbau der V-, D-, und J-Segmente erreicht, die so genannte „junctional diversity“. Die Bildung des variablen Teils aus unterschiedlicher Kombination der schweren Kette mit den beiden leichten Ketten-Varianten verdoppelt die Vielfalt beim Menschen noch ein weiteres Mal [11, 32]. Da das Huhn nur eine  $\lambda$ -ähnliche leichte Kette und auf dieser leichten wie auch auf der schweren Kette nur jeweils ein funktionelles V-Gen und ein funktionelles J-Gen sowie 15 hochhomologe D-Segmente auf der schweren Kette besitzt, wird durch die somatische Rekombination nur eine sehr geringe Antigendiversifität erreicht, so dass eigentlich alle präbursalen B-Zellen einen uniformen B-Zellrezeptor tragen. Der Mechanismus, welcher anstelle der Rekombination beim Huhn für die Ausbildung eines breiten Antigenrezeptor-Reservoirs verantwortlich zeichnet, ist die Gene Conversion [13, 33].

### 2.2.2.2. Bursale Phase

Die Besiedelung der Bursa mit Vorläufern der B-Zelllinie erfolgt beim Huhn im Gegensatz zum Säuger in einer einzigen Invasionswelle zwischen Tag 8 und Tag 14 der Embryonalentwicklung, mit einem Maximum an Embryonaltag 12 [27]. Dabei wandern in jeden der 8.000 bis 10.000 Bursafollikel nur zwischen 5 und 10 präbursale Stammzellen ein [34]. Als einzig bisher bekannter Faktor, welcher in einen Zusammenhang mit der B-Zell-Einwanderung gebracht wird ist dabei das Adhäsionsmolekül Sialyl Lewis X zu nennen, ein Kohlenhydrat-Epitop auf B-Vorläuferzellen. Es dient als Ligand für Selektine, Rezeptoren welche die Adhäsion an Gefäßwände vermitteln [35]. Sialyl Lewis X wird ausschließlich auf präbursalen und bursalen Stammzellen exprimiert, wobei die Expression ab dem 15. bis 17. Embryonaltag stetig abnimmt. Es wird vermutet, dass Sialyl Lewis X die Einwanderung der B-Vorläufer-Zellen in die Bursa entlang der Blutgefäße begünstigt. Die Expression von Sialyl Lewis X sinkt etwa zur gleichen Zeit, zu der die B-Zellen die Fähigkeit verlieren in Transplantations-Versuchen eine von B-Zellen befreite Bursa zu besiedeln [20]. Zeitgleich mit der abnehmenden Expression von Sialyl Lewis X wird Lewis X, ein in seiner Struktur verwandtes Kohlenhydratepitop verstärkt exprimiert, es erfolgt also ein Switch im Glykosilierungsmuster der B-Zellen von Sialyl Lewis X zu Lewis X. Letzteres wird vermehrt auf B-Zellen exprimiert, die sich im Stadium der Gene Conversion befinden und nimmt seinerseits deutlich ab, kurz bevor die B-Zellen beginnen aus der Bursa zu emigrieren [36].

Zwischen ET13 und ET15 beginnen die B-Zellen in den Bursalfollikeln zu proliferieren [37] bis jeder der Follikel in einem Alter von drei bis fünf Wochen ca.  $10^5$  Zellen enthält. Dieser Vorgang wird auch als selektive Expansion bezeichnet, da sich nur die Zellen vermehren, welche ein funktionales Immunglobulin-Rearrangement durchlaufen haben, d.h. jene Zellen, welche IgM in ihrer Zellmembran exprimieren können [38]. Bis heute ist nicht geklärt, welche Signale genau zur Selektion der B-Zellen und deren nachfolgender klonaler Expansion führen. Gegen die These, dass ein spezifischer B-Zellrezeptor-Ligand auf Stromazellen dafür verantwortlich sein könnte [39], spricht, dass sich auch B-Zellen mit einem trunkiertem, also nur aus dem konstanten Teil bestehenden B-Zellrezeptor, in Embryonen weiterentwickeln und noch zum Zeitpunkt des Schlupfes nachweisbar sind [40]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sIg zur Assoziierung des BCR-Komplexes innerhalb der Zelle, welcher aus den transmembranären Signalmolekülen Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  sowie dem B-Zellrezeptor besteht, notwendig ist. Erst danach kann der vollständige Komplex in die Membran translokiert werden. Die Expression von Ig $\alpha$  und Ig $\beta$  auf der Zelloberfläche könnte sodann als Signal für die Proliferation der B-Zellen dienen [41].

Es wird vermutet, dass für die Differenzierung der B-Zellen verschiedene Hormone, wie beispielsweise das von den Stromazellen gebildete Tripeptid Bursin (Lys-His-Gly-NH<sub>2</sub>) eine entscheidende Rolle spielen. Bursin wird mit dem erstmaligen Auftreten von IgM-positiven B-Zellen während der bursalen B-Zellentwicklung in Verbindung gebracht [42].

Ab dem 15. bis 17. Embryonaltag beginnt die Diversifizierung des Immunglobulinrezeptors durch Gene Conversion [43] und damit die Ausbildung eines hochvariablen Antigenrezeptorrepertoires in den Bursafollikeln. Entdeckt wurde dieser Mechanismus durch Analysen von cDNA-Sequenzen aus Hühnermilzen, mittels derer viele unterschiedliche L-Ketten von B-Zellrezeptoren identifiziert wurden. Im Vergleich zur genomischen Sequenz des funktionellen V-Gens wiesen diese L-Ketten bestimmte Nukleotidsubstitutionen in ihren V-Segmenten auf, welche wiederum Nukleotidsequenzen von Pseudogenen entsprachen [33]. Als Pseudogene werden Genabschnitte bezeichnet, welche benachbart zu einigen funktionellen Genen liegen und zu diesen gewisse Sequenzähnlichkeiten aufweisen, jedoch aufgrund fehlender funktioneller Anteile nicht exprimierbar sind. So wurden beispielsweise „upstream“ des funktionellen V-Gens der leichten Kette 25 Gensegmente gefunden, welche eine hohe Homologie zum funktionellen V-Gen aufwiesen, jedoch weder ein Leader-Exon noch eine Promoter-Region aufweisen und damit nicht auf der Zelloberfläche exprimierbar waren. Des Weiteren fehlen diesen Genabschnitten bestimmte, für das Gene Rearrangement benötigte Signalsequenz-Motive, die so genannten „recombinatorial signal sequences (RSS)“, weshalb sie nicht für die V-D-J-Rekombination verwendet werden können. Bei der Gene Conversion werden Nukleotidsequenzen aus diesen Pseudogenen in das funktionelle V-Gen transferiert [13]. Dabei werden Pseudogene in räumlicher Nähe und hoher Homologie ebenso bevorzugt als Donoren verwendet, wie solche, die in „antisense“-Richtung zum eigentlich funktionellen Gen vorkommen, deren Nukleotidabfolge also in umgekehrter Richtung verläuft [44]. Durch die Verwendung der Gene Conversion als Differenzierungsmechanismus können im Huhn theoretisch bis zu 10<sup>11</sup> verschiedene B-Zellrezeptoren generiert werden [13].

Um den Zeitpunkt des Schlupfes beginnen die B-Zellen in die Peripherie zu emigrieren. Dies trifft jedoch nur auf einen kleinen Teil aller bursalen B-Zellen zu, die restlichen 95 % gehen noch in der Bursa in Apoptose [45]. Bei den apoptotischen Zellen handelt es sich v.a. um solche, die nicht in der Lage sind, erfolgreich Immunglobulin auf ihrer Oberfläche zu exprimieren [46]. Bei Versuchen mit B-Zellen, welche einen trunkierten Immunglobulin-Rezeptor auf ihrer Oberfläche trugen, konnte gezeigt werden, dass dieser zwar für die Proliferation der B-Zellen während der Embryonalentwicklung ausreichend ist, jedoch für die folgende Emigration der B-Zellen aus der Bursa ein vollständiger Immunglobulin-Rezeptor

notwendig ist und solche Zellen, die lediglich einen trunkierten B-Zellrezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, in Apoptose gehen [47]. Weiterhin wurde chL12, ein ca. 39 kDa großes Oberflächen-Antigen, in Zusammenhang mit dem Überleben von B-Zellen gebracht, nachdem gezeigt werden konnte, dass apoptoseresistente B-Zellen eine signifikant höhere Expression von chL12 gegenüber apoptotischen Zellen aufwiesen [48]. Des Weiteren konnte durch die Überexpression von humanem Bcl-2 in der Bursa, dessen anti-apoptotische Wirkung auch im Huhn bestätigt werden [49]. Ein weiterer Überlebensfaktor für die B-Zellen, chBAFF (B-cell activating factor belonging to the TNF family) wird beim Huhn als vorwiegend autokrines Zytokin sowohl von reifen B-Zellen, als auch von immaturren bursalen B-Zellen exprimiert und ist für das Überleben und die Reifung bursaler B-Zellen wie die Aufrechterhaltung des peripheren B-Zellpools verantwortlich [50-51].

### **Postbursale Phase**

Um den Zeitpunkt des Schlupfes beginnen die B-Zellen aus der Bursa zu emigrieren, ein Prozess, welcher bis zur Involution der Bursa im Alter von 4-6 Monaten anhält. Die Auswanderungsrate der B-Zellen steigt dabei bis zu einem Alter von drei Wochen auf 1 % der peripheren B-Zellzahl pro Stunde. Dabei werden verschiedene B-Zellpopulationen anhand ihrer Herkunft und Überlebensraten unterschieden [52]. Zum ersten die aus dem Follikel-Cortex stammenden B-Zellen, die mit einer Halbwertszeit von 30 Stunden sehr kurzlebig sind und 60-70 % der peripheren B-Zellzahl ausmachen. Es wird vermutet, dass diese Zellen naive B-Zellen darstellen, welche noch keinen Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hatten. Die mit einem Anteil von 35 % zweitgrößte Gruppe hat eine Halbwertszeit von 12 Tagen und stammt vermutlich aus der Follikel-Medulla. Diese Zellen scheinen durch Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen zu langlebigeren B-Zellen gereift zu sein [53]. Die kleinste und dafür langlebigste Population hat bei einem Anteil von 5 % eine Überlebenszeit von über 100 Tagen. Diese Zellen teilen sich auch außerhalb der Bursa und sind damit am wahrscheinlichsten die Vorläufer jener Zellen, die nach der Bursainvolution den peripheren Pool an postbursalen, sIg<sup>+</sup> Stammzellen aufrechterhalten [26].

Die emigrierenden Zellen besiedeln im Folgenden die sekundären lymphatischen Organe (siehe 2.1) wo es nach Antigen-Stimulation zur Ausbildung germinaler Zentren kommt [54]. Dort findet die Affinitätsreifung der Immunglobulin-Rezeptoren durch erneute Gene Conversion und somatische Hypermutation statt [55]. Hierbei kommt es durch Punktmutationen v.a. im variablen Teil der leichten und schweren Kette bei einigen B-Zellrezeptoren zu einer besseren Affinität für ihr spezifisches Antigen. Diese werden anschließend bevorzugt für die Bildung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen und immunkompetenten Gedächtniszellen

herangezogen [56]. Außerdem findet in den germinalen Zentren der Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM zu den dem Huhn eigenen Antikörperklassen IgA und IgY statt [57]. IgY stellt ein Äquivalent zum IgG des Säugers dar, welches jedoch auch Eigenschaften von IgE aufweist, und damit als Zwischenform dieser beiden Immunglobuline einzuordnen ist [58].

### **2.2.3. Regulation der B-Zellentwicklung**

Während der zeitliche Ablauf der Phasen der B-Zellentwicklung innerhalb der Embryonalentwicklung, sowie die molekularen Vorgänge der B-Zellrezeptor-Diversifizierung beim Huhn mittlerweile beschrieben sind, ist nur sehr wenig über mögliche regulatorische Faktoren bekannt, welche die B-Zelleinwanderung, -reifung, und -emigration steuern könnten. Ebenso ist bisher unklar, welche Faktoren neben einer möglichen Signalübertragung durch den trunkierten B-Zellrezeptor Einfluß auf die Entscheidung über Proliferation oder Apoptose und damit das Schicksal der individuellen B-Zelle haben. Neben den bereits beschriebenen Adhäsionsfaktoren Sialyl Lewis X und Lewis X (siehe 2.2.2), welche in Zusammenhang mit der Einwanderungen der B-Zellen in die Bursa gebracht werden, sind hierfür vermutlich lösliche Proteine wie Zytokine oder Chemokine sowie membranständige Proteine verantwortlich. Zu den Zytokinen werden die Interleukine, Interferone, „TGF- $\beta$ “ (transforming growth factor- $\beta$ ), die Tumor-Nekrose-Faktor-Familie (TNF-Familie), „colony-stimulating factors“ (CSF-Faktoren) und Chemokine gezählt. Die Mitglieder der TNF Familie haben vielfältige Aufgaben im Immunsystem und nehmen Einfluss auf Überleben, Differenzierung und Tod der daran beteiligten Zellen. Die Mitglieder der TNF-Familie, welche als erstes beschrieben wurden, sind das seit 1968 bekannte Lymphotoxin- $\alpha$  und das 1975 entdeckte TNF- $\alpha$  [59]. Zwischenzeitlich sind 19 Mitglieder der TNF-Familie identifiziert worden [60]. Vom Säuger ist bekannt, dass die Mitglieder der TNF-Familie „B-cell activating factor belonging to the TNF-family“ (BAFF), APRIL und CD40-Ligand wichtige Funktionen in der Entwicklung von B-Zellen haben. BAFF spielt beim Huhn als ein von den B-Zellen autokrin sezerniertes Zytokin eine entscheidende Rolle für die B-Zellreifung, das Überleben der B-Zellen in der Peripherie sowie für den Immunglobulin-Klassenwechsel [50] [61]. Auch APRIL übermittelt Signale für das Überleben der B-Zellen und deren Differenzierung [62]. Die Aktivierung von CD40 auf der B-Zelloberfläche durch CD40-Ligand auf T-Zellen fördert die B-Zellaktivierung sowie die Differenzierung während der germinalen Zentrumsreaktion und schützt die B-Zellen vor Apoptose [63]. Neben den Hühner-Äquivalenten zu „BAFF“, „APRIL“ und „CD40L“ konnten bislang auch die Zytokine IL-10, IL-6, IL-19, IL-22 und IL-26 beim Huhn nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden bisher keine Proteine gefunden, welche analog zu TNF- $\alpha$  oder Lymphotoxin- $\alpha$  des Säugers sind [64].

## 2.3. Proteomische Studien

Der Begriff Proteom wurde 1994 von dem Australier Marc R. Wilkins auf einem wissenschaftlichen Kongress zur Proteomforschung im italienischen Siena geprägt, in Anlehnung und Analogie zu den Begriffen Genom und Transkriptom. Die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment, unter exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt, wird demnach als Proteom bezeichnet. Proteomische Studien gewinnen seit dieser Zeit zunehmend an Bedeutung und stellen neben der Transkriptomik eine der wichtigsten Techniken zur Untersuchung biologischer Veränderungen auf molekularer Ebene dar. Proteine sind die funktionellen Einheiten fast aller biologischen Prozesse und die Proteinexpression in Geweben zeigt sehr oft keine Übereinstimmung mit der Expression von transkribierter Messenger-RNA [65]. Auch geben transkriptomische Daten keinerlei Aufschluss über den Beginn und das Ende einer Proteinsequenz, molare Masse oder Ladung eines Proteins sowie dessen Menge innerhalb einer Zelle oder eines definierten Gewebes. Ebenso wenig können regulatorisch bedeutsame, posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen transkriptomisch erfasst werden. Daher bietet die Proteomik eine einzigartige Möglichkeit, strukturelle und funktionell genomische Ansätze zu komplementieren und dadurch zur Überbrückung der „Lücke zwischen Sequenz und Phänotyp“ [65] beizutragen.

Mittels proteomischer Techniken lassen sich einerseits qualitative „Proteininventare“ biologischer Systeme erstellen, deren Ergebnis eine Proteinliste der in einer Zelle, einem bestimmten Gewebe oder einer Körperflüssigkeit detektierten Proteine ist. Andererseits lassen sich die relativen Abundanzverhältnisse von Proteinen innerhalb zweier oder mehrerer definierter biologischer Zustände mittels quantitativer proteomischer Analysen vergleichen, wobei die Abundanzveränderung ein Indiz für die unmittelbare oder mittelbare Beteiligung des Proteins am untersuchten biologischen Phänomen ist. Je nach Fragestellung lassen sich so die unterschiedlichsten proteomischen Analyseverfahren für die molekulare Charakterisierung biologischer Systeme verwenden.

### 2.3.1. Proteomanalysen der B-Zelle

Schon früh wurden Proteindatenbanken eingerichtet, welche Aufschluss über die in einer bestimmten Zellpopulation identifizierten Proteine geben. So existieren beispielsweise mittels 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) und nachfolgender massenspektrometrischer Analysen angefertigte Datenbanken für humane CD19<sup>+</sup>-B-Zellen, neben solchen für CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen [66]. Dabei stellte sich heraus, dass die



Proteome dieser drei Zellpopulationen zwar deutlich voneinander abgrenzbar waren, jedoch keiner der identifizierten Proteinspots spezifisch für B-Lymphozyten war. Damit besteht zwar die Möglichkeit, mittels 2D-PAGE Zellen unterschiedlicher Populationen zu differenzieren, jedoch zeigt die Abwesenheit bekannter B-Zell-spezifischer Marker wie CD19 oder Anteilen des Immunglobulin-Rezeptorkomplexes in den charakteristischen Proteomen die Limitationen dieser gelbasierten Technik [65].

Einen Beitrag in Hinblick auf funktionelle Analysen der B-Zelle leisteten Studien muriner B-Zellen, welche durch Lipopolysaccharid aktiviert wurden und aus deren Protein anschließend so genannte „2D-Gel-Maps“ erstellt wurden, 2D-Gelbilder mit möglichst vielen identifizierten Proteinspots [67]. Hierbei konnten neben unterschiedlichen Enzymen, regulatorischen Proteinen, Chaperonen und Strukturproteinen auch Immunglobuline sowie ein ribosomales Protein und ein Histon-Protein detektiert werden.

In einer weiteren Studie konnte unter der Verwendung von einer *in vitro*-Kultur aus Lymphom-B-Zellen gezeigt werden, dass B-Zellen vor der Produktion löslicher Antikörper eine Vielzahl funktionell verwandter Proteine in aufeinanderfolgenden Wellen synthetisieren [68]. So scheint in Plasmazellen noch vor der Massenproduktion von Immunglobulinen die metabolische Kapazität für die sekretorische Maschinerie erhöht zu werden.

Während sich die bisher genannten Studien auf mature B-Zellen und deren Funktion bezogen, sind für ein besseres Verständnis der B-Zellentwicklung jedoch auch solche Untersuchungen essentiell, die sich auf Veränderungen zwischen den einzelnen B-Zell-Reifungsstadien beziehen.

### **2.3.2. Proteomanalysen unterschiedlicher B-Zell-Entwicklungsstadien**

In 2D-Gel-Analysen unterschiedlicher Reifungsstadien humaner B-Zellen konnten eindeutige Änderungen im Proteinexpressionsprofil während der B-Zellentwicklung nachgewiesen werden [69]. So wurden ausschließlich in den Pro-B-Zellen, d.h. denjenigen Zellen, welche noch keinen Immunglobulinrezeptor auf ihrer Oberfläche tragen, wohl aber bereits der V-D-J-Rekombination für die schwere Kette unterliegen, die Proteine „RAD52-related protein“ und „Chromatin assembly factor 1“ detektiert. RAD52 ist ein bekanntes Protein für DNA-Reperatur-Mechanismen [70] während „Chromatin assembly factor 1“ eine Rolle bei der Modifizierung der Chromatinstruktur spielt, einem entscheidenden Punkt bei der Transkriptionskontrolle vieler Gene und des Gene Rearrangements [71]. Erhöhte Expressionslevel in Pro-B-Zellen gegenüber den anderen Entwicklungsstadien zeigten die mikrotubulären Proteine „Tubulin  $\alpha$ -6“ und „Tubulin  $\alpha$ -1“, sowie das „Heat shock protein 60“.

Heat shock-Proteine (HSP) sind in vielfältige zelluläre Prozesse involviert, bei welchen es ihre Aufgabe ist, andere Proteine zu modulieren. So wird beispielsweise vermutet, dass HSP70 während der V-D-J-Rekombination Protein-DNA-Komplexe remodeliert [69]. Ebenso zeigten die nukleären Proteine „Tom22-Homolog“, „Histon acetyltransferase“, „GAG Polyprotein“ und „Apolipoprotein A1“ erhöhte Expressionslevel. Tom22 oder „translocase at the mitochondrial outer membrane“ ist als Rezeptor in der Membran von Mitochondrien bekannt, welcher für die Erkennung und Translokation zytosolisch synthetisierter mitochondrialer Proteinvorstufen verantwortlich ist [72]. Die „Histon acetyltransferase“ modifiziert die Chromatinstruktur im Kern und spielt damit eine Rolle in der Transkriptions-Regulation vieler Gene [73]. Weiterhin konnten in den frühen B-Zellstadien die Transkriptionsfaktoren E2A und Pax5 identifiziert werden, deren essentieller Einfluß auf das frühe Stadium der B-Zell-Entwicklung inzwischen vielfach beschrieben wurde [74-75].

Im Stadium der Prä-B-Zellen, welches durch die Expression eines unvollständigen Prä-B-Zellrezeptors, bestehend aus einer schweren Kette und einer so genannten „surrogate light chain“ oder „ersatzweisen“ leichten Kette als Platzhalter für die funktionelle leichte Kette gekennzeichnet ist, lassen sich gegenüber den Pro-B-Zellen erhöhte Level der Signalproteine Ayk1, LCK und Soc-2 nachweisen. Für die Tyrosin-Proteinkinase LCK sind bereits eine Reihe von Funktionen in der Entwicklung von Lymphozyten beschrieben [76].

Für die reifen B-Zellen, welche beim Menschen neben funktionellem IgM auch Immunglobulin-Moleküle der Klasse IgD in ihrer Membran tragen, konnte eine erhöhte Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2, sowie von Proteinen des MAP-Kinase-Signalwegs nachgewiesen werden [77]. Der MAP-Kinase-Signalweg ist bei der Regulation vielfältiger Prozesse wie Embryogenese, Zelldifferenzierung, Zellwachstum oder dem programmierten Zelltod beteiligt.

### **2.3.3. Proteomanalysen der Bursa Fabricii**

Während proteomische Analysen auf Zellebene Einblicke in die Struktur und Funktion einzelner Zell-Populationen geben, erfordert das Verstehen der Biologie höherer Organismen so genannte „Whole organ proteomics“, also die Proteomanalysen ganzer Organe. Innerhalb der Bursa Fabricii spielen die Stromazellen eine essentielle Rolle für eine normale B-Zellentwicklung [78]. Über diese sehr heterogene Zellpopulation und deren Interaktion mit den B-Zellen ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Ebenso weiß man nur sehr wenig über die Mechanismen, welche in der Bursa Apoptose, Differenzierung und Proliferation der B-Zellen steuern, bzw. die intra- und interzellulären Signale, welche für die B-Zellentwicklung von

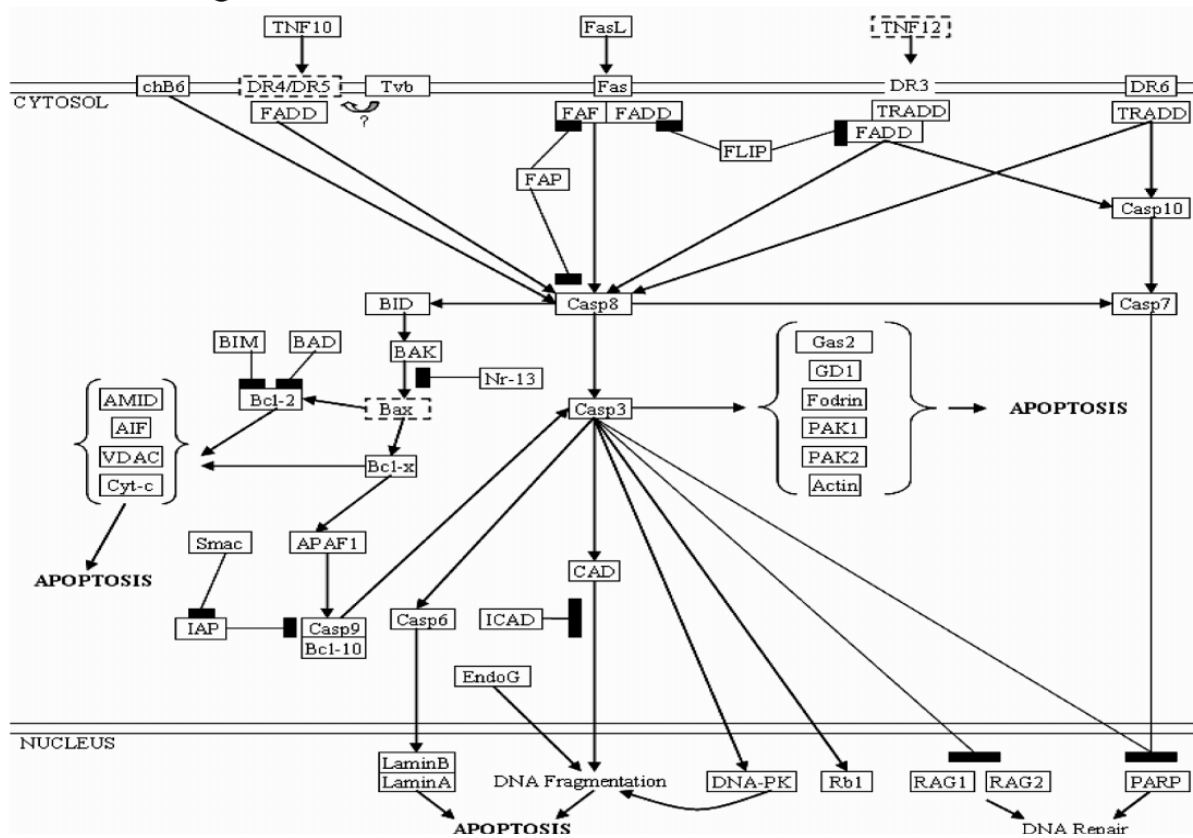
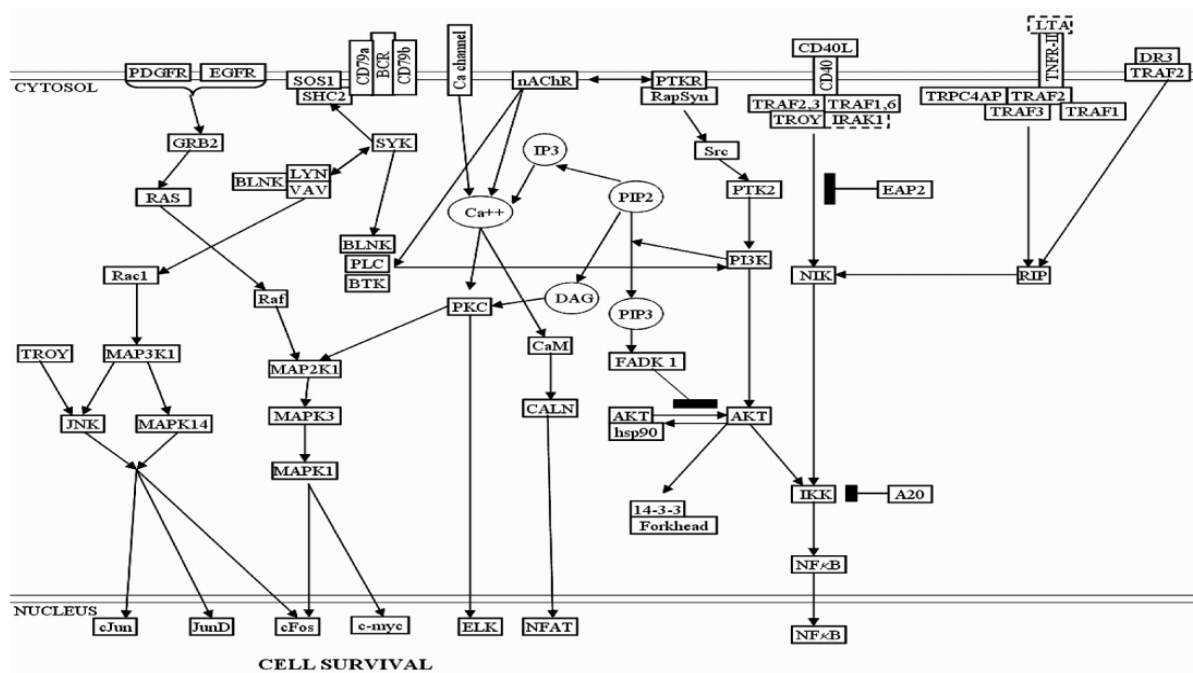
Bedeutung sind. Qualitative Proteomanalysen bursaler Stromazellen und bursaler B-Zellen drei Wochen alter Hühner mittels LC-MS/MS konnten Proteine identifizieren, welche an den aus dem Säuger bekannten Pathways des programmierten Zelltods (programmed cell death, PCD) sowie Zellproliferation und -differenzierung beteiligt sind [79]. Abb. 4 zeigt ein Modell dieser Pathways im Huhn, welches durch Eingliederung der in der Bursa identifizierten Proteine in die entsprechenden Säuger-Pathways erstellt wurde. Als Vertreter der apoptoserelevanten Proteine in der Bursa sind somit „Cytochrom C“, der „Apoptotic protease-activating factor 1“, AMID, die „Endonuclease G“, „Apoptosis inducing factor“ und Smac zu nennen. Hierbei konnte in den B-Zellen eine höhere Anzahl an apoptotischen Proteinen nachgewiesen werden als in den Stromazellen. Des Weiteren ist in den B-Zellen ein höherer Anteil dieser Proteine nicht-mitochondrialen Ursprungs, ein Ergebnis, welches durch die Fraktionierung der Stroma- und B-Zell-Proben in die Zellkompartimente Zytoplasma, Membran und Kern mittels differentieller Detergenz-Fraktionierung („Differential detergent fractionation“, DDF) generiert werden konnte [80].

Weiterhin konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass das Hühnergenom neuartige „Death-Rezeptoren“ (DR) enthält, wie z.B. chB6 und TvB. Während TvB sehr homolog zum DR4 des Säugers ist, zeigt chB6 keine nahe Verwandtschaft zu Säuger-DRs, ist aber dennoch zu den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren der Klasse 2 (TNFR2) zu zählen. ChB6 aktiviert vermutlich den programmierten Zelltod über die Caspase 8 [81].

Als anti-apoptotisches Protein konnte Bcl-2 identifiziert werden, obwohl die Bcl-2-mRNA transkriptomischen Daten zur Folge in der Bursa nach dem Schlupf herunterreguliert ist [82]. Mit Bax wurde ein weiteres, jedoch pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-Familie in der Bursa detektiert.

**Abb. 4 Programmierter Zelltod und Zell-Überleben in der Bursa (nach McCarthy et al. [79])**

Durch Eingliederung von Hühner-Proteinen in Säuger-Pathways für programmierten Zelltod (A) sowie Zell-Proliferation und Differenzierung (B) wurde ein Modell für die biologischen Prozesse in der Bursa erstellt.

**A. Programmed Cell Death****B. Cell Proliferation and Differentiation**

Unter den Proteinen, welche in Zusammenhang mit dem Überleben von Zellen gebracht werden, fanden sich auch Proteine des Acetylcholin-Signalwegs. In weiteren Studien konnte festgestellt werden, dass viele „neuronale Proteine“ in der Bursa Fabricii exprimiert werden [83]. Ebenfalls werden häufig cholinerge Rezeptoren auf aviären B-Zellen gefunden [84].

Die B-Zell-Differenzierung in der Bursa beinhaltet viele Rezeptor-Ligand-Interaktionen, z.B. wird E-Selektin von Stromazellen exprimiert und bindet, wie beim Säuger gezeigt werden konnte, sowohl Sialyl Lewis X- als auch Lewis X-Kohlenhydratstrukturen [85], deren differentielle Expression in Zusammenhang mit der Einwanderung von B-Zellen in die Bursa Fabricii während der Embryonalentwicklung gebracht werden [86]. Viele Rezeptor-Ligand-Interaktionen sind in Zell-Zell-Adhäsionskontakte oder Interaktionen mit der extrazellulären Matrix oder der Basalmembran involviert. Auch das Protein „A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5“ (ADAMTS-5) aus Stromazellen ist bei der Proteolyse der extrazellulären Matrix beteiligt [87] und könnte eine Rolle bei der Migration der B-Zellen durch die Basalmembran spielen, einem wichtigen Schritt in der B-Zell-Entwicklung [53]. Tab. 1 zeigt eine Übersicht weiterer, in der Bursa Fabricii identifizierter Rezeptor-Liganden-Paare, darunter in Zusammenhang mit der B-Zell-Entwicklung bekannte Proteine wie chIL6, CD40, IL2 und Sialyl Lewis X sowie Lewis X und deren jeweilige Interaktionspartner.

**Tab. 1 Rezeptor-Liganden-Paare in der Bursa Fabricii (nach McCarthy et al. [79])**

Übersicht mittels proteomischer Analysen bursaler B-Zellen und Stromazellen identifizierter Rezeptoren und deren zugehöriger Liganden aus der Bursa Fabricii eines 21-Tage alten Haushuhns

Rezeptor	Gewebe	Ligand	Gewebe
N-cadherin	B-Zelle	Cadherin-4	B-Zelle
IL-2R, gamma chain	B-Zelle	IL-2	B-Zelle
Ephrin type-A receptor 5	B-Zelle	Ephrin-A5	B-Zelle
Ephrin type-A receptor 3	Stroma	Ephrin-A5, Ephrin-A3	B-Zelle/Stroma
Fibroblast growth factor receptor	B-Zelle/Stroma	FGF13	B-Zelle
Gp 130-like monocyte receptor	Stroma	chIL6	B-Zelle
Neuropilin-1	B-Zelle	Semaphorin 3A	Stroma
C-Serrate-1	B-Zelle	Notch 1	B-Zelle/Stroma
Notch 2	B-Zelle/Stroma	ADAM 10, C-Delta 1	Stroma
CD40-Homolog	Stroma	Putative CD 154	B-Zelle/Stroma
Integrin beta-1 (RGD-receptor)	Stroma	ADAM12	Stroma
E-cadherin	Stroma	E-cadherin binding protein E7	Stroma
Similar to axonin 1	Stroma	Nr-CAM	Stroma
VLDL/vitellogenin receptor	Stroma	Vitellogenin	B-Zelle/Stroma
Vitronectin	Stroma	Integrin alpha-V	Stroma
Integrin alphaV/beta6	B-Zelle/Stroma	Tenascin	Stroma
Epidermal growth factor receptor	B-Zelle	Epidermal growth factor	Stroma
ELAM1 (E-selectin)	Stroma	Sialyl Lewis X, Lewis X	B-Zelle

Diese Aufstellung soll hier jedoch lediglich als Übersicht für in der Bursa identifizierte Rezeptoren und deren Liganden dienen, da sie nicht ausschließlich sinnvolle Zuordnungen der Proteine zu den untersuchten Fraktionen aufzeigt. So wurde beispielsweise ein üblicherweise auf B-Zellen exprimiertes CD40-Homolog aus der Stromazell-Fraktion identifiziert, was vermutlich auf Verunreinigungen der einzelnen Fraktionen zurückzuführen ist.

Abschließend lässt sich sagen, dass auf proteomischer Ebene bereits viele unterschiedliche Faktoren identifiziert wurden, welche verschiedene Funktionen innerhalb der B-Zellentwicklung steuern. Bisher wurde jedoch keine zeitliche Zuordnung dieser Faktoren zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien innerhalb der bursalen Entwicklung vorgenommen. Dies sollte nun in der vorliegenden Arbeit durch differentielle Analysen der Bursa Fabricii zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten erfolgen.

### **3. ZIELSETZUNG**

Aufgrund der bisher nur unzureichend charakterisierten Vorgänge in der bursalen B-Zellentwicklung und des daraus resultierenden Bedarfs zusätzlicher Grundlagenforschung in diesem Bereich, war es das Ziel dieser Arbeit, die molekularen Vorgänge bei der B-Zellentwicklung in der Bursa Fabricii des Haushuhns mittels proteomischer Analysen zu charakterisieren. Hierfür sollten sowohl qualitative als auch quantitative Proteomanalysen der Bursa zu relevanten biologischen Entwicklungsstadien, sowie eine zusätzliche qualitative Analyse des bursalen B-Zell-Proteoms durchgeführt werden. Der aus der Anwendung dieser Technologien entstehende Datenpool soll dann genutzt werden, um mögliche Kandidatengene für B-Zellreifung und -funktion zu identifizieren.

## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. Tiere und Tierhaltung

Für die Organentnahmen der Bursa Fabricii wurden Eier der Marke „LSL“ (Lohmann Selected Leghorn) der Firma Lohmann Tierzucht, welche alle aus einer Legeperiode stammten, unter Standardbedingungen ausgebrütet. Nach dem Schlupf erfolgte die Aufzucht der Tiere in kleinen Gruppen in Gitterrostkäfigen. Sie erhielten handelsübliches Alleinfutter und Wasser ad libitum.

### 4.2. Probennahme

#### 4.2.1. Organentnahme der Bursa Fabricii

Für die quantitativen und qualitativen Proteomanalysen wurde die Bursa Fabricii der Tiere zu definierten Entwicklungszeitpunkten entnommen. Es wurden jeweils 9 biologische Replikate an Embryonaltag 10 (ET10), Embryonaltag 18 (ET18), Tag 2 und Tag 28 nach dem Schlupf gewonnen, davon je sechs für quantitative Analysen, je eines für die qualitative Proteomik und je zwei als Reserve. An ET 10 wurden je 15 Organe zu einer Probe zusammengefasst, an ET18 und Tag 2 entsprach jeweils eine Bursa einer Probe und an Tag 28 wurde jeweils eine Bursa-Plica als Probe entnommen. Die Anzahl der verwendeten Eier richtete sich nach der Anzahl der geplanten biologischen Replikate zu den ausgewählten Entwicklungszeitpunkten (siehe Tab. 2).

**Tab. 2 Berechnung der benötigten Anzahl an Eiern**

Zeitpunkt	Replikate Quantitativ	Replikate Qualitativ	Replikate Reserve	Gesamtzahl Eier
ET 10	6	1	2	135
ET 18	6	1	2	9
Tag 2	6	1	2	9
Tag 28	6	1	2	9
Summe				162



#### **4.2.1.1. Material**

##### ***Präparationsbesteck***

Scheren unterschiedlicher Größen

Pinzetten unterschiedlicher Größen

##### ***Skalpell***

##### ***Binokular***

##### ***Filterpapier***

##### ***Glas-Petrischale, 15 cm Durchmesser***

##### ***Probenröhrchen mit Schraubverschluß***

##### ***Stickstoff-Transportbehälter***

##### ***flüssiger Stickstoff***

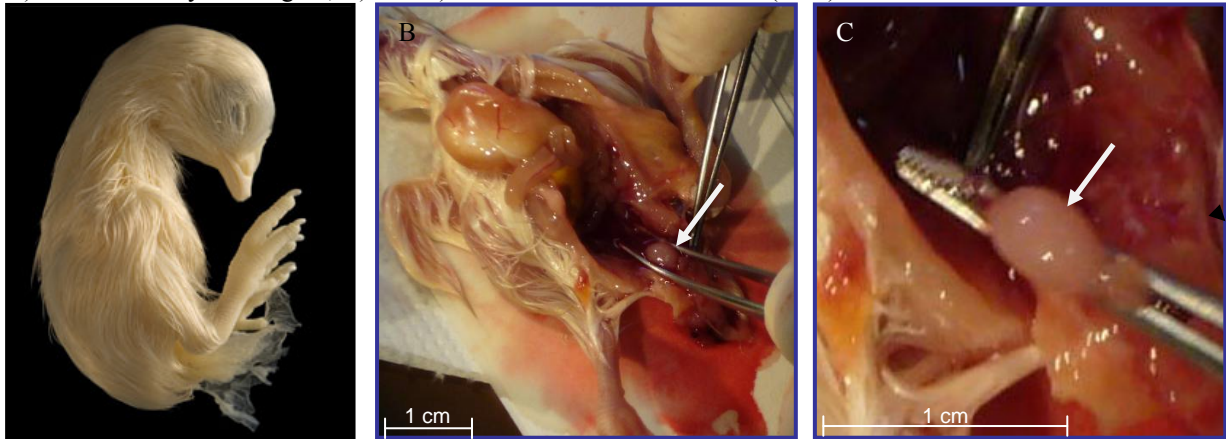
#### **4.2.1.2. Durchführung**

Nach Öffnung der Eier durch Aufschlagen der Eischale an der Wand der Glas-Petrischale und Entnahme der 10 oder 18 Tage alten Embryonen wurden diese sofort mit einem Scherenschlag unterhalb des Kopfes getötet. Danach wurden die Tag 10 und Tag 18 Embryonen in Dorsallage auf ein Filterpapier gelegt und im Fall der ET10 Embryonen unter einem Binokular platziert. Mit einer kleinen Schere wurde die Bauchhöhle, ausgehend vom Nabel bis zum Halsansatz eröffnet. Nachdem mit einer Pinzette der Magen und daran anhaftende Darmanteile zur besseren Sicht kranio-lateral außerhalb des Situs verlagert wurden, wurde das Colon ca. 1 cm oberhalb des Bursa-Ansatzes mit einer Pinzette abgeklemmt, oberhalb dieser durchtrennt und das verbleibende Enddarmstück mit anhängender Bursa Fabricii nach außen geklappt. Das so freipräparierte Organ (siehe Abb. 5) wurde mit Schere und Pinzette entnommen, in ein Probenröhrchen mit Schraubverschluss überführt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Die 2 und 28 Tage alten Hühner wurden mittels Kopfschlag betäubt, direkt im Anschluss durch Ausbluten getötet und ebenfalls in Rückenlage auf einem Seziertisch platziert. Anschließend wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba bis zur Carina sterni eröffnet, um eine kaudale, partielle Laparotomie durchführen zu können. Die weiteren Schritte erfolgten analog der Organentnahme bei den Embryonalstadien. An Tag 28 wurde das Organ nach der Entnahme mit dem Skalpell in 2 Hälften geteilt, um eine der nun gut sichtbaren Bursafalten zu entnehmen, in ein Probenröhrchen zu überführen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Im Anschluß wurden alle Proben gewogen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C gelagert.

**Abb. 5 Organentnahme an ET18**

A) Hühner-Embryo an Tag 18, B) und C) Entnahme der Bursa Fabricii (Pfeil)



[www.microscopy-uk.org.uk](http://www.microscopy-uk.org.uk)

Aus vorausgehenden praktischen Präparationsübungen ging hervor, dass die Entnahme von ca. 10 Bursen innerhalb eines Zeitraumes von einer Stunde möglich ist. Damit ergab sich für die Organentnahme von 9 biologischen Replikaten an ET10, bestehend aus je 15 gepoolten Organen, ein Zeitraum von mindestens 13,5 Stunden. Um dennoch einen vergleichbaren Entwicklungsstand der Embryonen in diesem frühen Stadium gewährleisten zu können, wurde die Bebrütung der Eier zur Organentnahme des ET 10 zeitversetzt (10 Eier/Stunde) begonnen.

#### 4.2.2. Präparation von bursalen B-Zellen

In der Bursa Fabricii befinden sich zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten unterschiedliche Anteile an B-Zellen. Während die Bursa an ET10 neben Stromazellen nur ungefähr 10 % B-Zellen enthält, besteht eine reife Bursa an Tag 28 nach dem Schlupf zu über 95 % aus B-Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass die in der Bursa enthaltene B-Zell-Zahl einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Veränderungen im Gesamt-Bursa-Proteom der verschiedenen Zeitpunkte hat. Daher wurde zusätzlich zu den Analysen der Bursastadien eine qualitative Analyse des bursalen B-Zell-Proteoms durchgeführt.

##### 4.2.2.1. Material

###### *Präparationsbesteck*

Scheren unterschiedlicher Größen  
Pinzetten unterschiedlicher Größen  
Skalpell

###### *Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)*

8,0 g	Natriumchlorid <sup>3*</sup>
1,45 g	Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat <sup>3</sup>

\* Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang alphabetisch aufgeführten Bezugsquellen

0,2 g	Kaliumdihydrogenphosphat <sup>3</sup>
0,2 g	Kaliumchlorid <sup>3</sup>
ad 1 L	Aqua bidest.
Einstellen des pH auf 7,2 mit HCl	

*steriles Metallsieb, Maschenweite 0,75 mm x 0,75 mm*

*Spritze, 20 ml*

*sterile Petrischale*

*Reagier-Röhrchen, 50 ml*

#### **4.2.2. Durchführung**

Die Bursa eines 4 Tage alten LSL-Huhns wurde nach Betäubung und Tötung durch Blutentzug steril entnommen, sofort in 4° C kaltes PBS überführt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Bursa in eine mit 30 ml PBS gefüllte Petrischale gegeben und mit dem Spritzenstempel einer 20 ml Spritze durch ein engmaschiges Metallsieb gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reagier-Röhrchen überführt und zur Sedimentation von größeren Gewebestücken für ca. 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Überstand abgenommen, bei 8° C und 225 x g für 10 min zentrifugiert, und das erhaltene Zellpellet mittels Magnetic Cell Sorting weiterverarbeitet.

#### **4.2.3. B-Zell-Separation mittels Magnetic Cell Sorting (MACS)**

MACS ist eine Technik zur Separation einer gewünschten Zellpopulation aus einer Mischzellsuspension. Die Auftrennung erfolgt dabei über magnetische Säulen mittels kleiner magnetischer Partikel, so genannter „MicroBeads“, welche über Antikörper an die Zelloberfläche der Zielzelle gebunden werden. Dabei wird zunächst ein Antigen-spezifischer Antikörper zugegeben, hier gerichtet gegen den Hühner-B-Zell-Marker chB6, gefolgt von einem FITC-gekoppelten Antikörper (FITC = Fluoresceinisothiocyanat), welcher gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Als letztes wird ein anti-FITC-Antikörper zugegeben, welcher an ein „MicroBead“ gekoppelt ist. Die so markierten Zellen werden auf eine spezielle Trennsäule verbracht, welche eine kugelförmige Stahlmatrix enthält. Wird diese Säule nun in einen starken Magneten eingesetzt, bildet sich zwischen den Stahlkugeln ein magnetisches Feld aus, welches die markierten Zellen beim Durchlauf durch die Säule selektiv zurückhält, während alle übrigen Zellen in einer Negativfraktion aufgefangen werden. Anschließend wird die Säule aus dem Magneten entfernt und die Zielzellen können in einem zweiten Durchlauf als Positivfraktion von der Säule gewaschen werden.

#### 4.2.3.1. Material

##### *Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (siehe 4.2.2)*

##### *Reagier-Röhrchen, 50 ml und 15 ml*

##### *Separationsmedium*

25 ml	fetales Kälberserum <sup>12</sup> (FCS), 30 min bei 57° C inaktiviert
5 ml	Penicillin-Streptomycin-Lösung <sup>12</sup> (PS) (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)
ad 500 ml	RPMI <sup>12</sup> 1640 mit 0,532 g/l stabilem Glutamin
Lagerung	FCS und PS wurden in Aliquots bei -20° C, das Separationsmedium bei 4° C gelagert.

##### *Modifizierte Zählkammer nach Neubauer*

##### *Trypanblau-Färbelösung*

##### *Antikörper*

Maus-anti-chB6 <sup>17</sup> (Klon AV20) (1:50 in PBS)
Ziege-anti-Maus-IgG-FITC <sup>16</sup> (1:50 in Medium)

##### *MACS anti-FITC-Microbeads<sup>9</sup>*

##### *MACS Separation Column LS*

##### *MACS Separator*

##### *Messröhrchen für FACS*

##### *Fluo-Puffer*

5 g	Bovines Serum Albumin <sup>3</sup> (BSA)
50 mg	Natrium-Azid <sup>8</sup>
ad 500 ml	PBS
Lagerung	4° C

##### *7-Actinomycin-D (7-AAD)<sup>16</sup> (2,5 µg/ml)*

#### 4.2.3.2. Durchführung

Das wie unter 4.2.2 beschrieben gewonnene Bursa-Zellpellet wurde in 3 ml Separationsmedium resuspendiert und anschließend die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Es wurde darauf geachtet, dass die Viabilität der Zellen über 90 % betrug, da tote Zellen unspezifisch an die MACS-Trennsäule binden, und somit die Reinheit der Positivfraktion negativ beeinflusst würde.  $1,5 \times 10^8$  Zellen wurden in einem 50 ml Röhrchen abzentrifugiert (8° C, 225 x g, 10 min), das Zellpellet in 1 ml pro  $1 \times 10^8$  Zellen PBS mit anti-chB6 (AV20) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Separationsmedium und Abzentrifugieren bei 8° C und 225 x g für 10 min erfolgte für 15 min die Inkubation mit 500 µl pro  $1 \times 10^8$  Zellen anti-Maus-Ig-FITC-Lösung auf Eis. Nach erneutem Waschen wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet in 90 µl Separationsmedium pro  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl MACS anti-

FITC-Microbeads pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurde die Zellsuspension nochmals für 15 min im Dunkeln bei 6–12° C im Kühlschrank inkubiert. Während der letzten Inkubationszeit wurde die Trennsäule durch Einspannen in den Magneten und Waschen mit 3 ml Separationsmedium vorbereitet. Dann wurde die Probe erneut vorsichtig gewaschen und in 1 ml Separationsmedium pro  $1 \times 10^8$  Zellen aufgenommen. 25 µl der Zellsuspension wurden als Probe 1 – „Vor Separation“ für die anschließende FACS-Kontrolle (FACS = Fluorescence activated cell sorting) entnommen und auf Eis gestellt, der Rest in 2 ml Fraktionen auf die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde als „Negativfraktion“ markiert und 25 µl davon als Probe 2 für die FACS-Analyse auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Säule dreimal mit 4 ml Separationsmedium gewaschen, aus dem Magneten entnommen und auf ein 15 ml Falcon-Röhrchen gesetzt, in das mit Hilfe eines Stempels und weiteren 5 ml Separationsmedium die „Positivfraktion“ eluiert wurde. Das Eluat wurde nochmals gewaschen und in frischem Separationsmedium aufgenommen. Wiederum wurden 25 µl der „Positivfraktion“ als Probe 3 für die FACS-Analyse abgenommen und ebenfalls auf Eis gestellt.

Die Reinheit der Separation konnte nun ohne weitere Färbeschritte nach Überführen der Proben 1 bis 3 in Messröhrchen und Zugabe von 300 µl Fluo-Puffer sowie 10 µl 7-AAD für die Anfärbung toter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Danach erfolgte eine erneute Zählung der Zellen der Positivfraktion sowie drei weitere Waschschrte in PBS (Zentrifugation bei 8° C und 225 x g für 10 min), um mögliche Verunreinigungen der Proben durch bovine Proteine aus dem Separationsmedium zu minimieren. Anschließend wurden die Zellpellets in Aliquots zu  $1 \times 10^7$  Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C gelagert.

## **4.3. Probenvorbereitung**

### **4.3.1. Lyse der Bursaproben**

Die Aufbereitung der tiefgefrorenen Bursaproben erfolgte durch mechanische Zerkleinerung im „Precellys“-Gewebehomogenisator, welcher Organmaterial durch in Schwingung versetzte Keramikkügelchen zerkleinert.

#### **4.3.1.1. Material**

*Precellys® Soft tissue homogenizing CK14*

(Probenröhrchen mit Keramikkügelchen, 1,4 mm Durchmesser), 0,5 ml und 2 ml

**2D-DIGE-Lysepuffer**

10,5 g	Urea <sup>14</sup>
3,8 g	Thiourea <sup>16</sup>
1,0 g	3- 3-Cholamidopropyl-dimethyl-ammonium-1-propansulfonat <sup>16</sup> (CHAPS)
90,75 mg	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan <sup>14</sup> (TRIS)
ad 25 ml	Aqua bidest.
Einstellen des pH auf 8,5 mit HCl	
Lagerung	-20° C

**4.3.1.2. Durchführung**

Zunächst wurden die Proben in je ein Probenröhrchen mit Keramikkügelchen überführt und je 1 ml eisgekühlter 2D-DIGE-Lysepuffer pro 100 mg Gewebe zugegeben. Dabei wurden für Proben unter 50 mg (ET10) die 0,5 ml Röhrchen verwendet, für die übrigen Proben 2 ml-Röhrchen. Anschließend wurden zwei Zerkleinerungszyklen bei 5000 rpm für je 10 sec im „Precellys24“-Gewebe-Homogenisator der Firma Bertin mit 5 sec Pause durchgeführt. Daraufhin wurden die Proben 5 min auf Eiswasser gelagert, damit sich der gebildete Schaum absetzen konnte und dann für 10 min, ebenfalls in Eiswasser sonifiziert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g und 4° C konnte der Überstand abgenommen und aliquotiert werden. Ein kleiner Teil des Probenmaterials wurde direkt für die Proteinquantifizierung mittels eines Bradford-Assays (siehe 4.3.2) verwendet und der Rest anschließend zu je 50 µg aliquotiert und bei -80° C gelagert.

**4.3.2. Quantifizierung der Proteinmenge mittels Bradford Assay**

Zur Proteinquantifizierung der Proben wurde ein Bradford-Assay (nach Marion Bradford [88]) verwendet.

**4.3.2.1. Material**

*BSA Standard, 2 mg/ml*<sup>18</sup>

*2D-DIGE-Lysepuffer (s.4.3.1)*

*„Coomassie Plus“-Bradford-Reagenz*<sup>10</sup>

**4.3.2.2. Durchführung**

Die Bursa-Proben wurden jeweils im Verhältnis 1:10 und 1:20 in 2D-DIGE-Lysepuffer verdünnt, ebenso wurde eine Reihe an Standardverdünnungen von BSA nach Herstellerangaben im selben Puffer angefertigt. Die Zugabe des Bradford-Reagenz erfolgte nach dem für Microtiter-Platten vorgesehenen Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Plattenphotometer gemessen.

### 4.3.3. Lyse der B-Zellen

In Vorversuchen mit 2D-DIGE-Lysepuffer wurde eine Ausbeute von ca. 150 µg Protein pro  $1 \times 10^7$  Zellen ermittelt. Die Lyse der für das Experiment vorgesehenen B-Zell-Pellets erfolgte in Lämmli-Puffer direkt vor der Weiterverwendung im 1D-Gel (siehe 4.4.1).

#### 4.3.3.1. Material

##### *1x Lämmli-Puffer*

1,0 ml	0,5 M Tris <sup>14</sup> pH 6,8
0,8 ml	Glycerin <sup>14</sup>
1,6 ml	10 % SDS <sup>15</sup>
0,4 ml	gesättigte Bromphenolblau <sup>8</sup> -Lösung (in Aqua bidest.)
0,4 ml	β-Mercaptoethanol <sup>16</sup>
ad 16 ml	Aqua bidest.

Sofort verwenden

#### 4.3.3.2. Durchführung

Jedes B-Zellpellet wurde in 60 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen Lämmli-Puffer aufgenommen und durch mehrmaliges resuspendieren und darauf folgende 5 minütige Sonifikation lysiert. Anschließend wurden je 20 µl entsprechend ca. 50 µg Protein zur Verwendung im 1D-Gel weiterverarbeitet.

## 4.4. Qualitative Analysen

Um die Vielzahl der in einer biologischen Probe enthaltenen Proteine möglichst umfassend analysieren zu können, wurde eine qualitative Proteomanalyse über LC-MS/MS (Liquid Chromatographie, Tandem-Massenspektrometrie) durchgeführt. Hierfür werden die Proteine einer Probe zunächst mittels eindimensionaler Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen anschließend tryptisch verdaut. Die so entstandenen Peptidgemische werden daraufhin unter Zuhilfenahme der Flüssigchromatographie nach ihrer Hydrophobizität getrennt und die einzelnen Peptidfraktionen zeitversetzt in ein Massenspektrometer eluiert, wo deren einzelne Peptidmassen bestimmt werden.

#### 4.4.1. Vorfraktionierung der Proben mittels 1D-SDS-PAGE

Bei der eindimensionalen Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die in einer Probe enthaltenen Proteingemische anhand ihrer unterschiedlichen Masse und damit unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten in einer Gel-Matrix räumlich voneinander getrennt. Dabei wird zunächst die räumliche Sekundär- und

Tertiärstruktur der Proteine durch Spaltung der Wasserstoffbrücken mittels reduzierender Reagenzien wie  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Dithioerythrit (DTE) und/oder Hitzedenaturierung (Aufkochen auf 95° C) zerstört und anschließend die Eigenladung der Proteine durch ihre Umhüllung mit dem negativ geladenen Detergens Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate, SDS) überdeckt. Die so präparierten Proteine laufen nun innerhalb eines elektrischen Feldes durch die Gel-Matrix zur Anode, wobei kleine Proteine schneller voran kommen als große, was eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht bewirkt.

#### 4.4.1.1. Material

##### *Mini-PROTEAN 3 Gelelektrophorese-Einheit*

##### **4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8**

91 g	Tris <sup>14</sup>
2 g	SDS <sup>15</sup>
ad 500 ml	Aqua bidest.
Lagerung	4° C

##### **4x TrisCl/SDS Puffer pH 6,8**

6,05 g	Tris <sup>14</sup>
0,4 g	SDS <sup>15</sup>
ad 100 ml	Aqua bidest.
Einstellen des pH auf 6,8 mit HCl	
Lagerung	4° C

##### **APS 10 %**

0,5 g	Ammoniumperoxidisulfat <sup>8</sup> (APS)
ad 5 ml	Aqua bidest.
Lagerung:	-20° C in Aliquots von 110 $\mu$ l

##### **Trenngel 12 %**

3,5 ml	Aqua bidest.
2,5 ml	4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8
4 ml	Acrylamid-BIS-Lösung <sup>15</sup> (37,5:1; 30% w/v)
50 $\mu$ l	APS <sup>8</sup> 10%
10 $\mu$ l	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin <sup>14</sup> (TEMED)

in der aufgeführten Reihenfolge mischen, sofort verwenden

##### **Sammelgel 4 %**

3,05 ml	Aqua bidest.
1,25 ml	4x TrisCl/SDS Puffer pH 8,8
0,65 ml	Acrylamid-BIS-Lösung <sup>15</sup> (37,5:1; 30% w/v)
25 $\mu$ l	APS <sup>8</sup> 10%
7,5 $\mu$ l	TEMED <sup>14</sup>

in der aufgeführten Reihenfolge mischen, sofort verwenden



**5x Elektrophoresepuffer**

15,1 g	Tris <sup>14</sup>
72,0 g	Glycin <sup>14</sup>
5,0 g	SDS <sup>15</sup>
ad 1000 ml	Aqua bidest.
Lagerung	4° C

zum Gebrauch 1:5 mit Aqua dest. verdünnen

**SDS 10 %**

10 g	SDS <sup>15</sup>
100 ml	Aqua bidest.

**2x Lämmli-Puffer**

1,0 ml	0,5 M Tris <sup>14</sup> pH 6,8
0,8 ml	Glycerin <sup>14</sup>
1,6 ml	10 % SDS <sup>15</sup>
0,4 ml	gesättigte Bromphenolblau <sup>8</sup> -Lösung (in Aqua bidest.)
0,4 ml	β-Mercaptoethanol <sup>16</sup>
ad 8 ml	Aqua bidest.

Sofort verwenden

**„Dalton Mark VII-L Standard“<sup>16</sup> Molekulargewichtsmarker, (14-66 kDa)**

**„Wide Range“<sup>16</sup> Molekulargewichtsmarker, (6,5-205 kDa)**

**4.4.1.2. Durchführung**

Zunächst erfolgte der Aufbau der „Mini Protean 3“-Gießkammer für 8 cm x 7 cm große und 1mm dicke Gele nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Kammer zuerst mit dem Trenngel befüllt und dieses mit ca. 1 ml Aqua bidest. aus einer 2 ml Spritze überschichtet, wobei darauf geachtet wurde, dass die Einfüllung des Wassers durch die Spritzenkanüle langsam und kontinuierlich am Rand des linken Glasplatten-Spacers erfolgte. Dadurch wurde eine sich langsam nach rechts ausbreitende Trennlinie zwischen Gel- und Wasserphase sichtbar, welche bei korrekter Ausführung möglichst wenig Verwirbelungen aufwies. Nach ca. 30 minütiger Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser abgegossen und Reste vorsichtig mit einem Filterpapier aufgesaugt. Anschließend erfolgte die Überschichtung mit dem Sammelgel, in welches direkt ein Plastikkamm zur Formung von 10 Probestaschen unter Luftabschluß aufgebracht wurde. Nach erneuter ca. 30 minütiger Polymerisationszeit konnte der Plastikkamm entfernt und das Polyacrylamid-Gel in die mit 1x Elektrophoresepuffer befüllte Elektrophorese-Kammer überführt werden.

Für die Proben der vier Entwicklungszeitpunkte wurde je 50 µg Bursalysat aufgetaut, mit 2x Lämmli-Puffer im Verhältnis 1:1 vermischt, für 5 min bei 95° C aufgekocht und auf das Gel aufgebracht. Die B-Zell-Proben wurden direkt nach der Lyse in Lämmli-Puffer (siehe 4.3.3) ebenfalls bei 95° C gekocht und in die Geltaschen überführt.

Ebenso wurde eine Tasche pro Gel mit 10 µl Molekulargewichtsmarker befüllt. Für das Gel mit den B-Zell-Proben wurde der „Dalton Mark VII-L Standard“ Molekulargewichtsmarker und für das Gel mit den verschiedenen Entwicklungsstadien der „Wide Range“ Molekulargewichtsmarker verwendet. Anschließend wurde die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 25 mA gestartet, welche, nachdem die Bromphenolblau-Lauffront das Trenngel erreicht hatte, für eine Rest-Laufzeit von ca 1 h auf 50 mA erhöht wurde.

#### 4.4.2. Coomassie Färbung

##### 4.4.2.1. Material

###### *Coomassie-Färbelösung*

1 g	Coomassie-Brilliant-Blau R-250 <sup>16</sup>
1 L	Methanol (techn.) <sup>19</sup>
200 ml	Essigsäure <sup>14</sup>
ad 2 L	Aqua bidest.

###### *Entfärbelösung*

100 ml	Methanol (techn.) <sup>19</sup>
140 ml	Essigsäure <sup>14</sup>
ad 2 L	Aqua bidest.

##### 4.4.2.2. Durchführung

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel über Nacht in eine mit Coomassie-Färbelösung gefüllte, verschließbare Plastikbox gelegt und bei 40 U/min geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde das Gel in Entfärbelösung überführt und diese nach jeweils 30 min, nach 1,5 h und nach 3 h gewechselt.

#### 4.4.3. In-Gel-Trypsinverdau

##### 4.4.3.1. Material

###### *Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, 50 mM*

1,975 g	Ammoniumhydrogencarbonat <sup>13</sup> ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ )
ad 500 ml	Aqua bidest.

###### *Dithioerythrit-Lösung (DTE), 45 mM in $\text{NH}_4\text{HCO}_3$*

35 mg	DTE <sup>14</sup>
ad 5 ml	Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, 50mM

###### *Iodacetamid-Lösung, 100mM in $\text{NH}_4\text{HCO}_3$*

186 mg	Iodacetamid <sup>16</sup>
ad 10 ml	Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung, 50mM

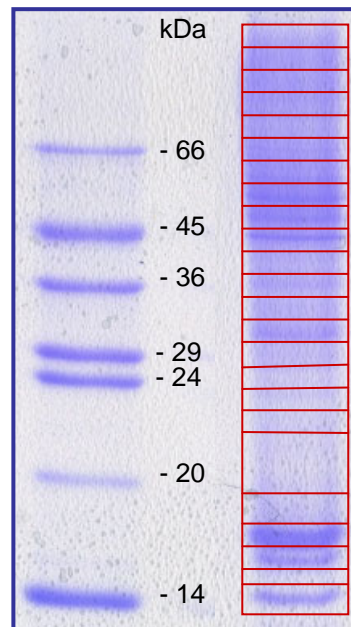
###### *Porcine Trypsin-Lösung (100 ng/µl)*

20 µg	Trypsin-Lyophilisat <sup>11</sup>
-------	-----------------------------------

200 µl	Trypsin-Resuspension-Puffer <sup>11</sup>
<b>70 % Acetonitril (ACN)</b>	
35 ml	ACN <sup>8</sup>
ad 50 ml	Aqua bidest.

#### 4.4.3.2. Durchführung

Zunächst wurden die Gelstreifen jedes Probenlaufes aus den zuvor Coomassiegefärbten 1D-Gelen mit Hilfe eines Skalpell in 24 Proteinbanden zerteilt (siehe Abb. 6), in je ein Proben-Cup überführt und mit ca. 500 µl Aqua bidest. zum Schutz vor Austrocknung überschichtet. Zur Weiterverarbeitung wurde das Wasser wieder abgenommen, jedes Gelstück mit 200 µl DTE-Lösung überschichtet und bei 55° C auf einem Schüttler (140 U/min) für 30min inkubiert, um eine Spaltung der proteineigenen Wasserstoffbrücken zu



**Abb. 6**  
**Ausschneiden der Proteinbanden**  
1D-SDS-Gel mit B-Zell-Lysat, Coomassie-Färbung. Die Schnittstellen der Banden sind rot markiert.

erreichen. Anschließend wurde die DTE-Lösung zur Alkylierung der durch die Spaltung der Wasserstoffbrücken entstandenen freien Thiolgruppen gegen 200 µl Iodacetamid-Lösung ausgetauscht und die Proben für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach Wechsel der Iodacetamid-Lösung und erneuter Inkubation (15 min, RT, 140 U/min) wurden die Gelstücke zwei Mal mit je ca. 200 µl Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen (je 15 min, RT, 140 U/min) und anschließend mit einer Pipettenspitze grob zerkleinert, bevor sie mit 50 µl Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung überschichtet wurden. Nach Zugabe von 1 µl der Trypsin-Lösung zu jeder Proteinbande (entsprechend 100 ng Trypsin auf ca. 2 µg Protein) wurden die Proben zum Verdau der Proteine über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die verdaute Lösung, mit den über Nacht aus den Gelstücken diffundierten Peptiden abgenommen und in separate Proben-Cups überführt. Die Gelstücke wurden mit je ca. 100 µl 70 %iger ACN-Lösung überschichtet und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die restlichen verdauten Peptide aus den Gelstücken zu extrahieren. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und mit der zuvor abgenommenen Peptidlösung vereinigt, die Proben in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° C gelagert.

#### 4.4.4. Liquid Chromatographie

Die Chromatographie dient zur Auftrennung eines Stoffgemisches durch unterschiedliche Verteilung seiner Einzelbestandteile zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Bei der Liquid Chromatographie (LC) oder Flüssigchromatographie ist die stationäre Phase fest und die mobile Phase flüssig. Der Trenneffekt beruht dabei auf der unterschiedlichen Polarität der stationären und der mobilen Phase. Bei der ursprünglichen Normalphasen-Chromatographie, war die stationäre Phase polar, z.B. Kieselgel, und die mobile Phase unpolar, z.B. Hexan. Bei der hier verwendeten Reversed-Phase-Chromatographie ist dagegen die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar. Für die stationäre Phase wurden modifizierte Kieselgel-Chromatographiesäulen mit langen, hydrophoben Kohlenstoffketten verwendet und für die mobile Phase niedrigprozentige Ameisensäure. Beim Durchlauf der Proben durch die Säule werden die hydrophoben Bereiche der Peptide aus der mobilen Phase herausgedrückt und an dem hydrophoben Reversed-Phase-Kieselgel gebunden. Bei der Gradienteneluierung wird die polare mobile Phase mit einem organischen Lösungsmittel, wie z.B. Acetonitril, in steigenden Konzentrationen vermischt, so dass die mobile Phase stetig unpolarer wird. Der Analyt wandert dann je nach eigener Polarität bei einer bestimmten Konzentration der mobilen Phase mit und so werden die einzelnen Peptidfraktionen nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Hier wurde eine nano-Reversed-Phase-Chromatographie-Anlage, die „nano LC ultra“ der Firma Eksigent verwendet. Der Zusatz „nano“ bezieht sich auf die extrem niedrigen Flußraten von wenigen Nanolitern pro Minute, welche durch sehr leistungsstarke Hochdruckpumpen in Kombination mit Säulen von sehr geringem Innendurchmesser erreicht werden. Diese niedrigen Flußraten führen zu einer hochkonzentrierten Elution der Peptide von der Säule und gewährleisten so eine hohe Sensitivität der Analysen, wodurch Peptidnachweise im Femtomol-Bereich ermöglicht werden.

##### 4.4.4.1. Material

###### **0,1 % Ameisensäure (Formic Acid, FA)**

1 ml	FA <sup>6</sup>
ad 1 L	„LiChrosolv“ <sup>8</sup> (Wasser für Chromatographie)

###### **84 % Acetonitril in 0,1 % FA**

840 ml	ACN <sup>8</sup>
1 ml	FA <sup>6</sup>
ad 1 L	„LiChrosolv“ <sup>8</sup> (Wasser für Chromatographie)

###### **Probengeber-Glasröhrchen, 1,5ml**

###### **„C18 PepMap100“, C18-Trappingsäule**

(Partikelgröße: 5 µm, 100 Å, Säuleninnendurchmesser: 300 µm, Säulenlänge: 50 mm)

**„C18 PepMap100“, C18-Trennsäule**

(Partikelgröße: 3 µm, 100 Å, Säuleninnendurchmesser: 75 µm, Säulenlänge: 150 mm)

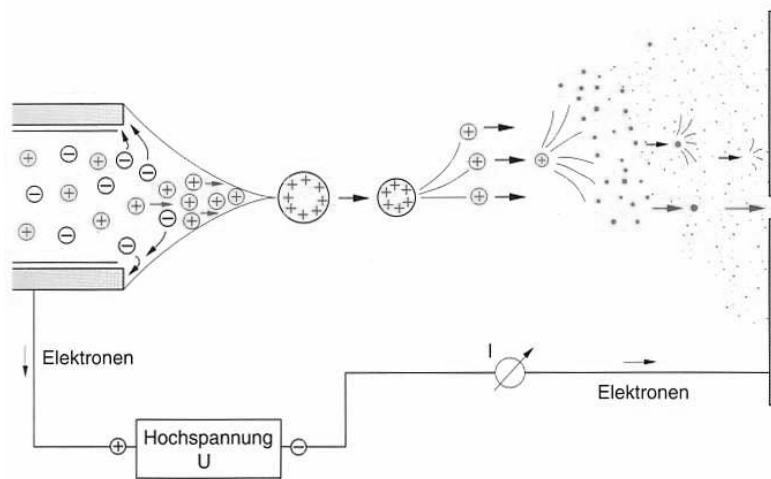
**4.4.4.2. Durchführung**

Die zuvor lyophilisierten Proben wurden nach dem Auftauen in jeweils 40 µl 0,1 %iger Ameisensäure gelöst und 15 min bei 4° C und 18.850 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, wobei darauf geachtet wurde, dass Verunreinigungen, wie z.B. Gelreste, welche die Chromatographie stören könnten, als „Schmutzpellet“ im Cup belassen wurden. 10 µl jeder Peptidlösung wurden in ein spezielles Probengeber-Glasröhrchen verbracht, in dessen Deckel eine Plastikmembran zur Injektion durch die Chromatographieranlage eingebracht ist und darin in den dafür vorgesehenen Halter des Autosamplers eingesetzt. Nach Programmierung der Anlage mit den korrekten Koordinaten für die Injektionen wurde jede Probe zunächst mit einer Flussrate von 10 µl/min mit Hilfe der mobilen Phase von 0,1 % Ameisensäure auf die C18-Trapping-Säule geleitet. Von dort aus wurden die Peptide auf die C18-Trennsäule weitergeleitet und bei einer Flussrate von 240 nl/min getrennt. Zur Auftrennung wurde ein Elutionsgradient von 0-84 % Acetonitril eingesetzt, welcher der mobilen Phase von initial 0,1 % FA über 150 min zugesetzt wurde.

**4.4.5. Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie (MS) dient zur Bestimmung von Molekülmassen für vielfältige Anwendungsbereiche. Zur Identifikation von Proteinen werden Peptide im Anschluss an ein Trennverfahren, in diesem Fall der Flüssigchromatographie, ionisiert und nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) getrennt. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, welche gasförmige Ionen produziert, einem Massenanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis auftrennt und einem Ionendetektor. Diese drei Einheiten befinden sich zumeist in einem Vakuum. Nachgeschaltet ist ein Computer, welcher die gemessenen Massenspektren speichert.

Für die Ionisation der Peptide gibt es unterschiedliche Verfahren, im vorliegenden Fall kam die Elektrospray Ionisierung (ESI) zur Anwendung. Hierbei werden die Peptide nach Lösung in saurem Milieu durch eine dünne Nadel geleitet und über eine Strecke mit hoher Potentialdifferenz gesprüht. Dabei verdampfen die elektrostatisch geladenen Tröpfchen der Probe im Gasstrom und eine zunehmende Ladungsdichte führt zur Coulomb-Explosion der Tröpfchen, wodurch ein stabiles Spray entsteht (siehe Abb. 7).



**Abb. 7 Elektrospray-Ionisierung**  
An der Spitze des Mikrospaykopfes bilden sich positiv geladene Tröpfchen, verdampfen im elektromagnetischen Feld und explodieren zu einem Ionsenspray

Quelle: Lottspeich, Bioanalytik, Spektrum Verlag 1998

Als Massenanalysator wurde eine elektrische Ionenfalle verwendet. Die Peptidionen werden durch eine Eintrittselektrode in die Ionenfalle geleitet und in ihrem Inneren mit Hilfe eines Dämpfergases, z.B. Helium abgebremst. Hier werden die Ionen durch ein zeitlich veränderliches, elektromagnetisches Feld gespeichert, d.h. sie zirkulieren auf Bahnen innerhalb der Ionenfalle. Durch Variation der Spannung verlassen Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis dann nach und nach die Falle und wandern in Richtung Ionendetektor. Hierbei macht man sich das Prinzip der massenselektiven Instabilität der Ionen zu nutze, d.h. kleine Ionen verlassen die Ionenfalle schon bei Anlegen einer niedrig frequenten Wechselspannung wohingegen Ionen mit einem größeren Masse-zu-Ladungsverhältnis die Ionenfalle erst bei höher frequenter Wechselspannung verlassen.

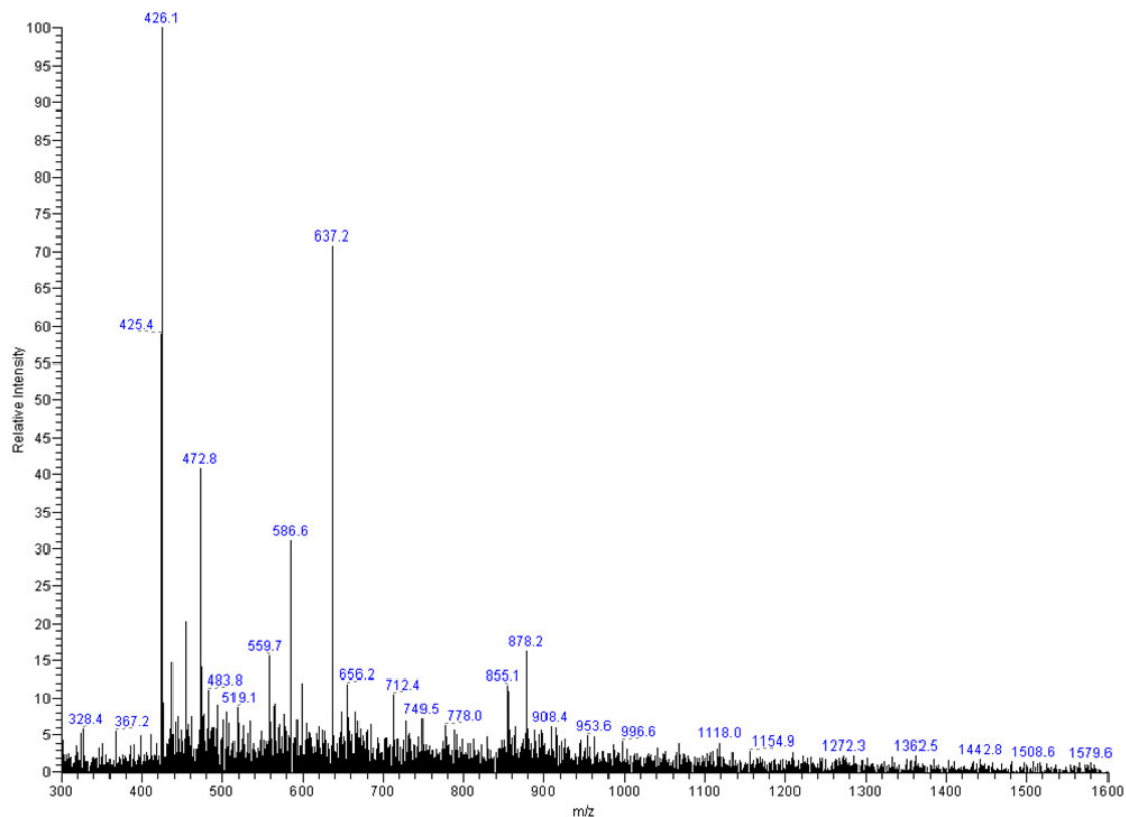
Das Ergebnis der Analysen sind sogenannte Massenspektren, Graphen bei denen die relative Signalintensität eines Ions am Ionendetektor gegen sein Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetragen wird (siehe Abb. 8).

Da für die Analyse komplexer Peptidgemische, wie sie beim Verdau von Proteinbanden aus einem 1D-Gel entstehen, eine Aussage über die Massen der enthaltenen Peptidionen für eine Identifikation der ursprünglich enthaltenen Proteine nicht ausreichend ist, wurde zusätzlich die Tandem-Massenspektrometrie (Tandem MS oder MS/MS), eine Technik zur Sequenzbestimmung der einzelnen Peptidionen angewendet. Dabei werden nach Bestimmung der Peptidmassen im Massenspektrometer in einem weiteren Messschritt Peptidionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis isoliert und diese dann mit einem Gas (z.B. Helium) zur Kollision gebracht, so dass die Peptide an ihren Peptidbindungen zerbrechen. Hierbei entsteht ein charakteristisches Fragmentmuster an Peptidbruchstücken

unterschiedlicher Länge aus dem dann die Aminosäuresequenz des entsprechenden Peptids abgelesen werden kann (siehe Abb. 9).

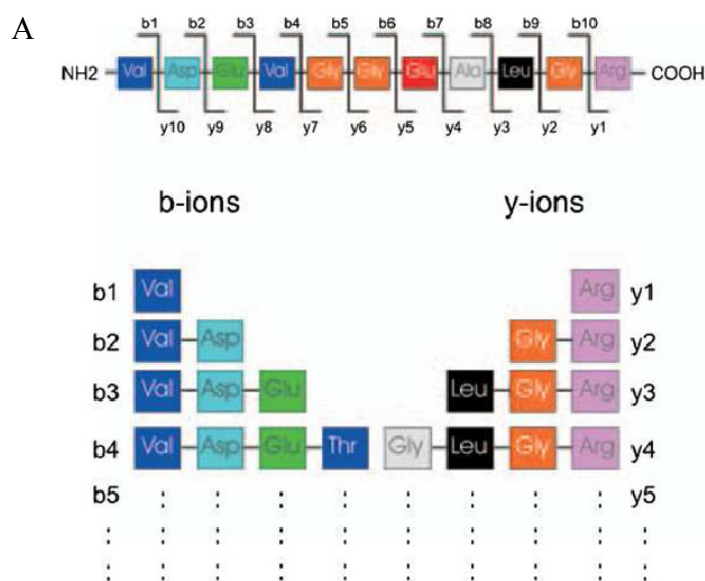
### Abb. 8 MS-Spektrum

Aufgetragen ist die relative Signalintensität (Ordinate) gegen das Masse-zu-Ladungsverhältnis  $m/z$  (Abszisse).



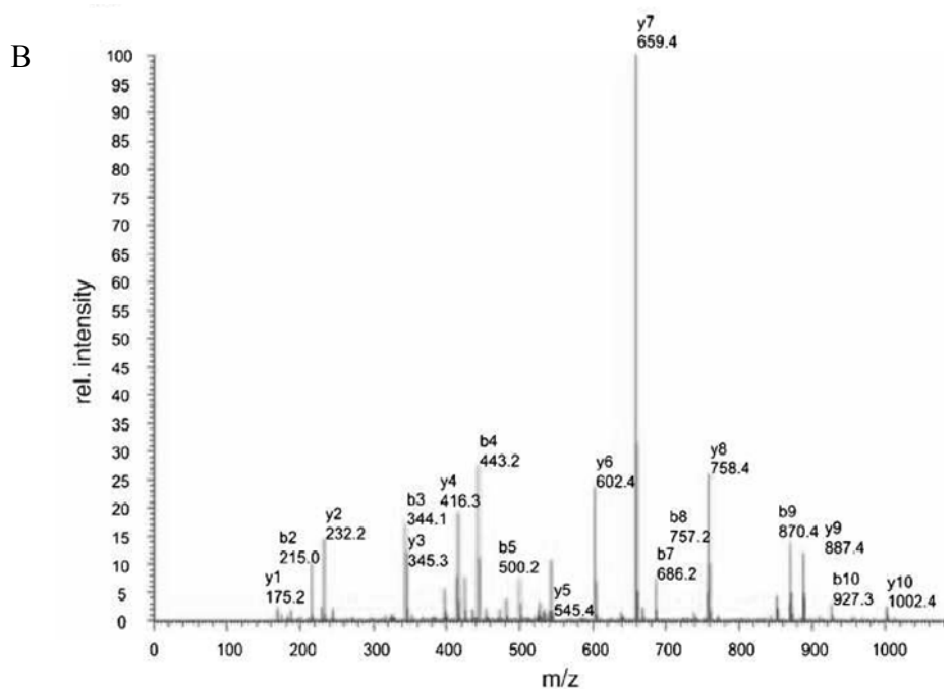
### Abb. 9 Peptidfragmentierung bei der MS-MS-Analyse

A. Schematische Darstellung der Bruchstellen an den Peptidbindungen und der dabei entstehenden charakteristischen Fragmente (N-terminale B-Ionen und C-terminale Y-Ionen).



Quelle: Thomas Fröhlich, LAFUGA, Gen Zentrum Großhadern

- B. Dargestellt ist ein MS-MS-Fragmentspektrum, aufgetragen ist die relative Signalintensität (Ordinate) gegen das Masse-zu-Ladungsverhältnis  $m/z$  (Abszisse). Jeder Peak steht für ein Peptid-Bruchstück, Massendifferenzen zwischen benachbarten Fragmenten entsprechen den bekannten Aminosäuremassen.



#### 4.4.5.1. Material

*„Distal coated Silica Tips“, Elektrospray-Nadeln*

#### 4.4.5.2. Durchführung

Im Anschluss an die chromatographische Auftrennung der Peptidfraktionen erfolgte eine direkte Einleitung des Säulen-Eluates in ein lineares Ionenfallen-Massenspektrometer („Finnigan LTQ“) der Firma Thermo Scientific. Die Elektrospray-Ionisierung der Peptide wurde mit „distal coated Silica Tips“ bei einer Nadelspannung von 1,4 kV durchgeführt. Für die Ermittlung der MS/MS-Spektren wurde Helium als Kollisionsgas eingesetzt, die Kollisionsenergie wurde auf 35 % eingestellt. Es erfolgte ca. alle 0,3 sec ein MS-Primärschweefen, aus dem die 3 intensivsten Precursor-Ionen ermittelt und für die MS/MS-Scans herangezogen wurden. Die im Gerät integrierte „dynamic exclusion“-Software garantierte dabei dafür, dass innerhalb eines Zeitraumes von einer Minute, nicht zweimal dasselbe Precursor-Ion für die MS/MS-Analysen herangezogen wurde.

#### 4.4.6. Identifizierung der Proteine über „MASCOT Search“

Zur Identifikation der Proteine wurde das Programm „MASCOT Search“ verwendet, eine Online-Suchmaschine, welche die im Massenspektrometer analysierten Peptid- und Peptidfragment-Spektren mit Spektren theoretischer Spaltungen aller in Frage kommenden Proteine in einer ausgewählten Datenbank vergleicht. Es erfolgt eine statistische Auswertung



der Übereinstimmungen, die eine Liste mit den Proteinidentitäten zur Folge hat, wobei für jedes Protein ein „Protein Score“ angegeben wird, der die Wahrscheinlichkeit widerspiegelt mit der dieses Protein richtig identifiziert ist.

#### 4.4.6.1. Durchführung

Die vom Massenspektrometer generierten Rohdaten wurden in Form von „RAW“-Dateien in die Suchmaske von „MASCOT Search“ geladen. Dabei entsprach jede in das Massenspektrometer eingebrachte Probe einer „RAW“-Datei, es wurde also pro Proteinbande eine Datei generiert. Als Datenbank wurde IPI-chicken (IPI = International Protein Index; Version 3.6) verwendet und folgende Suchparameter kamen zur Anwendung:

**Tab. 3 Suchparameter MASCOT Search**

Parameter	Auswahl
Enzyme	Trypsin
Taxonomy	All entries
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications	Oxidation (M)
Peptide tolerance	2,0 Da
MS/MS tolerance	0,8 Da
Peptide charge	1+, 2+, 3+
Instrument	ESI-Trap
Maximum missed cleavages	1

Für jede eingegebene „RAW“-Datei generiert „MASCOT Search“ eine Liste mit identifizierten Proteinen, geordnet nach deren „Protein Score“. Der „Protein Score“ wird dabei aus der Summe der „Ions Scores“ berechnet, welche die Wahrscheinlichkeit für die richtige Identifikation eines bestimmten Peptids angeben, d.h. die Wahrscheinlichkeit mit der die Übereinstimmung zwischen den experimentellen Daten und der Peptidsequenz in der Datenbank kein Zufall ist. Dieser Wert steigt an, je größer die Wahrscheinlichkeit für ein richtig identifiziertes Protein ist.

Um einen Anhaltspunkt zur Richtigkeit der erhaltenen Daten zu haben, wurden alle „RAW“-Dateien auch gegen eine so genannte „Decoy“-Datenbank gesucht, einer auf der IPI-chicken-Datenbank basierenden Datenbank mit randomisierten Proteinsequenzen, in der keine funktionellen Proteine annotiert sind, sondern die Aminosäuresequenzen der Proteine per Zufall neu angeordnet wurden. Diese Suche ergab als höchsten „Protein Score“ einen Wert von 51, weshalb die Grenze für noch akzeptierte Proteine in „MASCOT Search“ auf einen „Protein Score“ von mindestens 52 festgesetzt wurde.

#### 4.4.7. Datenauswertung mittels „Scaffold“-Analyse

„Scaffold“ ist ein Programm zur besseren Organisation und Aufbereitung von qualitativen proteomischen Daten. Es dient dazu, die mittels „MASCOT Search“ oder anderer Suchmaschinen identifizierten Proteine anhand von Tabellen und Graphen übersichtlicher darzustellen, statistisch zu evaluieren und so für anschließende Veröffentlichungen vorzubereiten. Ebenso können die qualitativen Daten in Excel-Tabellen exportiert werden, wobei stets alle verwendeten Suchparameter mit übertragen und so dokumentiert werden. Außerdem gibt es die Möglichkeit mehrere Proben innerhalb eines Experimentes miteinander zu vergleichen, d.h. z.B. die Anzahl der gemessenen Spektren eines bestimmten Peptids („Spectral Counts“) mit der Anzahl der Spektren desselben Peptids in einer anderen Probe zu vergleichen. So lassen sich Rückschlüsse auf die Menge dieses Peptids in den einzelnen Proben ziehen, es kann also eine relative Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Peptide und damit auch der dieses Peptid enthaltenden Proteine durchgeführt werden.

##### 4.4.7.1. Durchführung

Die in „MASCOT Search“ generierten Daten für jeden der vier Entwicklungszeitpunkte sowie für die B-Zellen wurden für jede Probe gesammelt in „Scaffold“ Version 2.6 geladen. Dies erfolgte im Sinne eines „Mudpit“-Experimentes, d.h. alle Proteinbanden eines Zeitpunktes, also beispielsweise 24 Proteinbanden an ET10 wurden gemeinsam in das Programm geladen. Die so generierte qualitative Übersicht entsprach somit der ursprünglichen Probe an ET10. Für die Analyse der qualitativen Daten wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

**Tab. 4 Grenzwerte Scaffold Analyse**

Parameter	Auswahl
Minimal Protein Propability	99 %
Minimal Peptide Propability	95 %
Minimal number of unique peptides	1

Dies bedeutet, dass nur Proteine berücksichtigt wurden, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 99 % richtig identifiziert sind, nur Peptide mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95 % Richtigkeit und dass jedes identifizierte Protein mindestens ein Protein-spezifisches Peptid, d.h. ein Peptid welches nur in diesem Protein vorkommt, enthält.

Ebenso wurden zur Kontrolle der gesetzten FDR (engl: False Discovery Rate; Rate möglicher falsch positiver Identifizierungen) von höchstens 1 %, hier definiert durch die minimale Protein-Wahrscheinlichkeit von 99 %, alle der mittels „Decoy“-Datenbanksuche generierten Dateien mit denselben Einstellungen in das Programm geladen. Hierbei erfüllte keines der

Proteine die oben genannten Kriterien. Dies bedeutet, dass bei dieser Analyse unter 1 % falsch positive Proteine identifiziert wurden, wodurch die bei 99 % gesetzte Protein-Wahrscheinlichkeit bestätigt werden konnte.

#### **4.4.8. Gene Ontology**

Um die qualitativen Daten weiter zu untersuchen, wurden die identifizierten Proteine einer genontologischen Analyse unterzogen. Dafür wurden zunächst alle IPI-Datenbanknummern der identifizierten Proteine über das „ID-Mapping“-Programm der „UniProt-Knowledgebase“, einer Vereinigung des European Bioinformatics Institute (EBI), des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) und der Protein Information Resource (PIR), UniProt-Nummern zugeordnet. Da für ein Protein mit einer IPI-Nummer oft mehrere UniProt-Nummern existieren, mussten anschließend alle mehrfach auftretenden Proteine in der Ergebnisliste wieder gelöscht werden, um eine artifizielle Anreicherung einzelner Proteine in den Datensätzen zu verhindern. Anschließend wurden die überarbeiteten Proteinlisten jedes Entwicklungszeitpunktes und der B-Zellen in das „Gene Ontology“-Programm der „UniProt-Homepage“ geladen und so die Proteine den einzelnen genontologischen Klassen zugeordnet.

## 4.5. Quantitative Analysen

Um die Protein-Expressionsprofile der Bursa Fabricii zu den vier gewählten Entwicklungszeitpunkten quantitativ zu vergleichen und damit Hinweise auf mögliche Faktoren für die B-Zell-Reifung und -Funktion zu erhalten, wurde eine differentielle Proteomanalyse mittels 2D-DIGE-Technologie (engl.: Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis; zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese) durchgeführt.

Bei der 2D-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Technik zur Auftrennung hochkomplexer Proteingemische. Auf einem 2D-Polyacrylamidgel können bis zu 10.000 Proteine aufgetrennt werden, wobei in der 1. Dimension nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine und in der 2. Dimension nach deren Molekulargewicht getrennt wird. Anschließend können die Proteine im Gel mit Silber- oder Coomassie-Färbung oder – im Fall von 2D-DIGE - mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden.

Mit der 2D-DIGE-Technik können mehrere Proben gleichzeitig auf einem Gel aufgetrennt werden, indem diese vor der Elektrophorese mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Vorteile dieser Methode sind die reduzierte Anzahl an erforderlichen Gelen innerhalb eines Experimentes sowie die fluoreszenzbasierte Quantifizierung der Proteinspots, welche einen hohen dynamischen Bereich von über  $10^3$  aufweist. Des Weiteren ist die Normalisierung aller Gele eines Experiments über die Verwendung eines internen Standards, des sogenannten „Internal Pooled Standard“ (IPS) möglich.

Zunächst wurden alle entnommenen Proben im Sinne einer Qualitätsprüfung einzeln auf 2D-Gelen aufgetrennt, welche anschließend mit Silber gefärbt wurden. Danach erfolgte die Erstellung der analytischen 2D-DIGE-Gele für die differentielle Proteomanalyse und abschließend wurden von jedem Zeitpunkt sogenannte präparative Gele, mit einem hohen Proteingehalt angefertigt, welche anschließend mit Coomassie gefärbt und für das Ausstechen der Proteinspots zu deren Identifizierung verwendet wurden.

### 4.5.1. Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) handelt es sich um das Trennverfahren der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese. Die Proteine werden auf einem schmalen Gelstreifen, dem sogenannten „IPG-Strip“ aufgetrennt, welcher immobilisierte pH-Gradienten (IPGs), d.h. kovalent mit dem Trägergel verbundene Ladungsträger enthält. Wird an dem Streifen eine elektrische Spannung angelegt, laufen die Proteine entsprechend ihrer Ladung in Richtung Kathode oder Anode bis sie im Gradienten-Gel die Stelle mit dem pH-Wert erreicht haben, an

dem ihre Nettoladung Null ist. Diesen Punkt nennt man auch den isoelektrischen Punkt des Proteins; er ist für jedes Protein spezifisch und abhängig vom seinem relativen Gehalt an sauren und basischen Aminosäureresten sowie posttranslationalen Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen oder Glykosilierungen.

Je nach Proteinmenge wurden zwei unterschiedliche Verfahren für die Beladung des Gelstreifens mit Proteinen verwendet. Für die silbergefärbten Gele, sowie für die analytischen, fluoreszenzgefärbten 2D-DIGE Gele wurde das „Cup Loading“ verwendet, eine Technik, bei der die Proteine kurz vor der Fokussierung in einem kleinen, trichterförmigen Behälter mit offenem Boden auf den Gelstreifen aufgebracht werden, von wo aus sie dann während der Fokussierung in den Gelstreifen einlaufen. Diese Technik wird bis zu einer Gesamtmenge von 150 µg Protein pro „IPG-Strip“ empfohlen. Für größere Proteinmengen, wie sie bei der Erstellung der präparativen Gele verwendet werden, wurden die Proteinproben dagegen bereits vor der Fokussierung im Zuge der Rehydratisierung der Gelstreifen direkt mit in den Streifen eingequollen.

#### **4.5.1.1. Material**

***„Immobiline DryStrips“, IPG-Streifen, pH 4-7, 24 cm***

***„Reswelling Tray“, Kassette für Rehydratisierung der Streifen***

##### ***Rehydratisierungspuffer***

12 g	Urea <sup>14</sup>
1 g	CHAPS <sup>16</sup>
200 µl	konzentrierte Bromphenolblau <sup>8</sup> -Lösung (in Aqua bidest.)
ad 25 ml	Aqua bidest

Lagerung -20° C

Kurz vor der Verwendung Zugabe von 2 mg DTE<sup>14</sup> und 10 µl „Pharmalyte, 3-10 for IEF“<sup>7</sup> (freie Trägerampholyte) pro 1 ml Puffer

##### ***Probenpuffer***

12 g	Urea <sup>14</sup>
1 g	CHAPS <sup>16</sup>
200 ml	konzentrierte Bromphenolblau <sup>8</sup> -Lösung (in Aqua bidest.)
ad 25 ml	Aqua bidest

Lagerung -20° C

Kurz vor der Verwendung Zugabe von 2 mg DTE<sup>14</sup> und 10 µl „Pharmalyte, 3-10 for IEF“<sup>7</sup> (freie Trägerampholyte) pro 1 ml Puffer

***2D-DIGE-Lysepuffer (siehe 4.3.1)***

***„Plus One DryStrip Cover Fluid“, Öl für IEF***

***„IPGphor Sample cups“ Proben-Cups für IEF***

***Filterpapierstückchen***

#### 4.5.1.2. Durchführung Cup Loading

Für die Silbergele wurden jeweils 50 µg Protein für einen Gelstreifen verwendet, für die analytischen Gele jeweils 3 x 50 µg pro Streifen, bestehend aus 2 x 50 µg Protein aus zwei unterschiedlichen Proben und 50 µg Protein aus dem internen Standard, welche vor der Fokussierung vereinigt wurden. Für die Fokussierung wurde die „IPGphor“, eine IEF-Apparatur der Firma Pharmacia Biotech verwendet und in einem Fokussierungs-Lauf wurden jeweils 6 Streifen gemeinsam fokussiert.

Über Nacht wurden die Gelstreifen in je 450 µl Rehydratisierungspuffer in der dafür vorgesehenen Kassette („Reswelling Tray“) nach Herstellerangaben gequollen. Am nächsten Tag wurden die Proben auf Eis aufgetaut, im Fall der analytischen 2D-DIGE-Gele miteinander vereinigt und anschließend mit jeweils demselben Volumen an Probenpuffer vermischt. Aus 2D-DIGE-Lysepuffer und Probenpuffer wurde ein 1:1-Mix erstellt und damit das Volumen der Proben auf insgesamt 100 µl aufgefüllt. Nach Herstellerangaben wurden die rehydratisierten Streifen in die Keramik-Kassette der „IPGphor“ eingelegt und je ein Proben-Cup auf den Strips befestigt. Anschließend wurden zum besseren Kontakt mit Aqua bidest. benetzte Filterpapierstückchen auf die Enden der Gelstreifen gelegt und die Elektroden auf diesen befestigt. Nach Übergießen der Streifen mit Öl wurden die Proben in die Proben-Cups pipettiert und ebenfalls mit 40 µl Öl bedeckt. Anschließend wurde die Fokussierung nach folgendem Programm gestartet:

**Tab. 5 Programm isoelektrische Fokussierung**

Schritt	Art	Max. Stromstärke (µA) / Streifen	Spannung (V)	Zeit (h)
1	Step and Hold	75	150	4
2	Step and Hold	75	300	3
3	Gradient	75	1000	6
4	Gradient	75	8000	1
5	Step and Hold	75	8000	6

Nach der Fokussierung wurden die Gelstreifen mit der Gelseite nach innen in eine Kunststoff-Petrischale überführt und bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.5.1.3. Durchführung Protein-Einquell-Methode

Für die präparativen Gele wurde bereits während der Rehydratisierung der Streifen jeweils 400 µg Protein zugefügt. Nach Auftauen der Proben auf Eis wurden die Proben mit demselben Volumen an Probenpuffer vermischt. Anschließend wurde das Volumen der Proben mit Rehydratisierungspuffer auf 450 µl aufgefüllt und die Gelstreifen darin über Nacht im „Reswelling Tray“ gequollen. Beim Aufbau der Fokussierungsapparatur wurde im

Folgenden auf die Proben-Cups verzichtet, die weiteren Schritte erfolgten analog zum Protokoll des „Cup Loading“.

#### **4.5.2. 2D-Gelelektrophorese**

##### **4.5.2.1. Material**

**„Ettan DALTsix“ Elektrophoresekammer**

**„Ettan DALTwelve“ Gießkammer**

**„1mm Gel Casting Cassettes“, Glasplatten, Vorder- und Rückseiten für sieben Gele**

**„Blank Cassette Inserts“, Plastik-Dummies für Gelkassetten**

##### **1,5 M TRIS-Lösung**

181,7 g      TRIS<sup>14</sup>  
ad 1 L      Aqua bidest.  
Einstellen des pH auf 8,8 mit HCl

##### **10 % SDS**

10 g      SDS<sup>15</sup>  
ad 100 ml      Aqua bidest.

##### **10 % APS**

10 g      Ammoniumpersulfat<sup>8</sup> (APS)  
ad 100 ml      Aqua bidest.  
  
Lagerung:      -20° C (6ml Aliquots)

##### **10 % TEMED**

100 µl      TEMED<sup>14</sup>  
ad 1 ml      Aqua bidest.  
  
sofort verwenden

##### **Gellösung**

250 ml      Acrylamid-BIS-Lösung<sup>15</sup> (37,5:1; 30% w/v)  
150 ml      1,5 M TRIS-Lösung pH 8,8  
187 ml      Aqua bidest.  
vermischen und 10 min entgasen  
  
6 ml      10 % SDS  
auf 5-7° C kühlen (Lagerung ca. 45 min bei -20° C)  
  
6 ml      10 % APS  
830 µl      10 % TEMED  
kurz vor dem Gießen zufügen

##### **Spritzen, 5 ml**

##### **Kanüle, 0,45 mm x 25 mm**

##### **Gießvorrichtung**

bestehend aus Trichter, Schlauch mit stufenlos verstellbarem Gießhahn,  
Pipettenspitze, Haltevorrichtung

**Äquilibrationpuffer**

0,6 g	TRIS <sup>14</sup>
36,4 g	Urea <sup>14</sup>
2,0 g	SDS <sup>15</sup>
30 ml	Glycerin <sup>14</sup>
ad 100 ml	Aqua bidest.

**Äquilibrationpuffer mit 1 % DTE**

0,9 g	DTE <sup>14</sup>
ad 90 ml	Äquilibrationpuffer

**Äquilibrationpuffer mit 2,5 % Jodacetamid (JA)**

2,25 g	JA <sup>16</sup>
200 µl	gesättigte Bromphenolblau <sup>8</sup> -Lösung (in Aqua bidest.)
ad 90 ml	Äquilibrationpuffer

**Laufpuffer 10x**

61 g	TRIS <sup>14</sup>
40 g	SDS <sup>15</sup>
288 g	Glycin <sup>14</sup>
ad 2 L	Aqua bidest.

**Laufpuffer 2x**

400 ml	Laufpuffer 10x
ad 2 L	Aqua bidest.

**Laufpuffer 1x**

600 ml	Laufpuffer 10x
ad 6 L	Aqua bidest.

**0,5 % Agarose-Lösung**

0,25 g	„Low Melting Point“-Agarose <sup>15</sup>
ad 50 ml	Laufpuffer 1x

2 x aufkochen und handwarm verwenden

**Glycerin-Bidest-Lösung (1:1)**

500 ml	Glycerin <sup>14</sup>
0,5 g	Bromphenolblau <sup>8</sup>
ad 1 L	Aqua bidest.

**Klarsichtfolie****4.5.2.2. Durchführung**

Zunächst wurden alle Glasplatten gründlich mit Wasser und Seife gewaschen und an der Luft getrocknet, bevor jeweils Vorder- und Rückseite eines Glasplattenpaares sorgfältig, unter Berücksichtigung eines planen Abschlusses der Kanten, aufeinander gelegt wurden. Die Gießkammer der „Ettan DALTwelve“-Apparatur wurde nach Herstellerangaben aufgebaut und mit Glasplatten für sieben Gele bestückt, wobei zwischen die Glasplattenpaare für die einzelnen Gele jeweils ein Gelkassetten-Dummie aus Plastik eingelegt wurde. Anschließend wurde ein Schlauch über ein aus einer abgeschnittenen 1ml-Pipettenspitze bestehendes



Verbindungsstück in die Einfüllöffnung der Gießvorrichtung gesteckt und an seinem anderen Ende mit einem Trichter verbunden, welcher an einer Haltevorrichtung oberhalb der Gießkammer angebracht wurde. Nun konnte die zuvor entgaste und gekühlte Gellösung mit APS und TEMED vermischt und sofort in den Trichter gefüllt werden. Bevor die Einleitung der Gelflüssigkeit in die Gießkammer durch den am Schlauch befindlichen Gießhahn gestartet wurde, wurden evtl. darin enthaltene Luftblasen sorgfältig durch Massieren des Schlauches entfernt. Anschließend wurde die Gelflüssigkeit langsam bis zu einer Höhe von ca. 5 cm unterhalb des oberen Randes der vorderen Glasplatten in die Gießkammer eingelassen, der Schlauch aus der Einfüllöffnung entfernt und Glycerin-Bidest-Lösung nachgespült, bis die Gele eine Füllhöhe von ca. 1 cm unterhalb des Glasplattenrandes erreicht hatten und sich keine Reste der Gellösung mehr in der Einfüllöffnung befanden. Sobald sich ein hydrostatisches Gleichgewicht der Flüssigkeiten eingestellt hatte, konnte mit der Übersichtung der Gele mit Aqua bidest. begonnen werden. Hierzu wurden mit Hilfe einer 5ml-Spritze und einer Kanüle langsam und kontinuierlich 3 ml Aqua bidest. auf den linken oberen Rand jedes Geles aufgebracht, so dass eine sich langsam nach rechts ausbreitenden Trennlinie zwischen Gel- und Wasserphase sichtbar wurde, welche bei korrekter Anwendung möglichst wenig Verwirbelungen aufwies. Anschließend wurde die Gießkammer luftdicht mit Klarsichtfolie abgedeckt und die Gele über Nacht polymerisiert.

Am nächsten Tag wurden sechs Gele aus der Gießkammer zur anschließenden Gelelektrophorese entnommen. Dann wurden sechs fokussierte Gelstreifen zunächst für 15 min in je 15 ml Äquilibrationpuffer mit DTE und anschließend für 15 min in je 15 ml Äquilibrationpuffer mit Jodacetamid auf einem Schüttler bei 80 U/min äquilibriert, d.h. die Proteine im Gelstreifen wurden reduziert, alkyliert und mit einer negativ geladenen SDS-Hülle umgeben. Anschließend wurde jeweils ein Gelstreifen nach Herstellerangaben auf ein Gel aufgelegt und mit 0,5 % Agarose-Lösung luftdicht überschichtet. Dabei war insbesondere darauf zu achten, dass sich zwischen Gelstreifen und Gel keine Luftblasen befanden, welche die anschließende Gelelektrophorese empfindlich gestört hätten. Nach 10 min wurden die Gele in die Haltevorrichtung der „Ettan DALTsix“-Elektrophoresekammer überführt, welche anschließend nach Herstellerangaben im unteren Teil mit 1x Laufpuffer und im oberen Bereich mit 2x Laufpuffer befüllt wurde. Die Laufkammer wurde an ein Kühlsystem, welches auf 9° C eingestellt wurde, und an ein Stromversorgungsgerät angeschlossen und die Elektrophorese nach folgendem Programm gestartet:

**Tab. 6 Programm 2D-Gelelektrophorese**

Schritt	Max. Stromstärke (mA)	Spannung (V)	Zeit (h)
1	60	80	1
2	240	500	6

### 4.5.3. Silberfärbung

#### 4.5.3.1. Material

Alle Lösungen wurden am selben Tag frisch angesetzt und sofort verwendet.

##### *Fixierlösung*

500 ml Ethanol<sup>1</sup> (techn.)  
 120 ml Essigsäure<sup>14</sup>  
 ad 1 L Aqua bidest.

##### *Waschlösung*

300 ml Ethanol<sup>1</sup> (techn.)  
 ad 1 L Aqua bidest.

##### *Imprägnierlösung*

0,22 g Natriumthiosulfat<sup>16</sup>  
 ad 1 L Aqua bidest.

##### *Silberlösung*

2 g Silbernitrat<sup>14</sup>  
 0,667 ml 37,5 % Formaldehyd<sup>13</sup>  
 ad 1 L Aqua bidest.

##### *Reduzierlösung*

60 g Natriumcarbonat<sup>8</sup>  
 0,5 ml 37 % Formaldehyd<sup>13</sup>  
 4 mg Natriumthiosulfat<sup>16</sup>  
 ad 1 L Aqua bidest.

#### 4.5.3.2. Durchführung

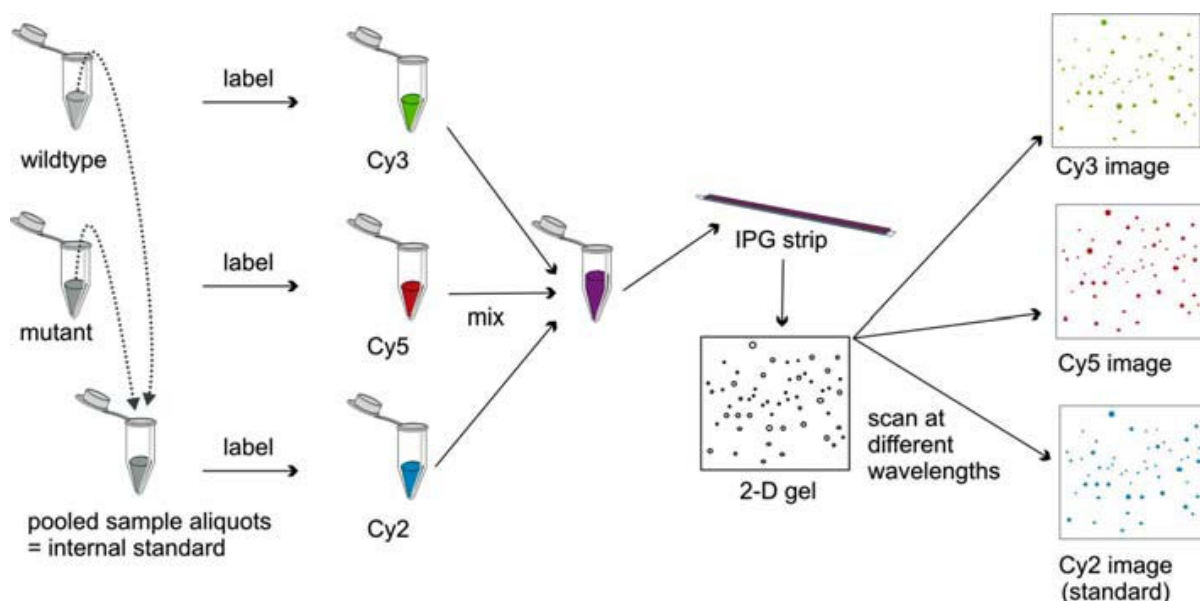
Sofort nach der Gelelektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten entnommen und über Nacht in einem Plastikbehälter mit je 500 ml Fixierlösung bei 40 U/min geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Gele 3 x 20 min in 30 % Ethanol gewaschen, dann für maximal eine Minute in Imprägnierlösung geschwenkt und anschließend für mindestens 20 min mit Silberlösung gefärbt. Anschließend wurde die Silberlösung entfernt und die Gele 2x ca. 20 sec in Aqua bidest. gewaschen. Danach wurden die Gele bis die Proteinspots sichtbar wurden in Reduzierlösung geschwenkt, diese dann verworfen und die Färbung mit Fixierlösung gestoppt, in welcher die Gele für mindestens 20 min belassen wurden. Vor dem Einlesen der Gele mit einem Dokumenten-Scanner der Firma Canon wurden sie 20 min in Aqua bidest. bis auf Originalgröße gequollen.

#### 4.5.4. Markierung der Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen

Bei der Fluoreszenzmarkierung werden die verschiedenen Proteingemische vor der eigentlichen Elektrophorese mit Fluoreszenzfarbstoffen, den sogenannten „Cyanine Dyes“ oder kurz „CyDyes“ markiert. Dadurch können bis zu drei verschiedene Proben, markiert mit den drei Farbstoffen Cy2, Cy3 und Cy5, auf einem Gel aufgetragen und gleichzeitig aufgetrennt werden. Nach der Elektrophorese wird das Gel dreimal gescannt, indem eine Anregung mit Licht drei verschiedenen Wellenlängen erfolgt und jeweils die emittierte Fluoreszenz detektiert wird. Dadurch erhält man für jede Probe drei separate digitale Gelbilder, welche dann zum Vergleich der Proben zu einem sogenannten Overlay übereinander gelegt werden können. Sollen innerhalb eines Experimentes Proben verglichen werden, welche auf verschiedenen Gelen gelaufen sind, wird auf jedem Gel ein interner Standard, bestehend aus einem Pool aller im Experiment enthaltenen Proben, mit aufgetragen. Dieser Standard wird auch als „internal pooled standard“ oder IPS bezeichnet und dient zur Normalisierung der Signalintensitäten über mehrere Gele. Dadurch ist einer der drei Farbstoffe (zumeist Cy2) mit dem IPS besetzt und es sind pro Gel zwei weitere Farbstoffe (Cy3 und Cy5) für die Markierung der verschiedenen Proben einsetzbar. (siehe Abb. 10)

##### Abb. 10 Fluoreszenzmarkierung und 2D-DIGE

Dargestellt ist die Markierung zweier unterschiedlicher Proben („wildtype“ und „mutant“) mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5. Anschließend wird ein interner Standard aus beiden Proben erstellt, welcher mit Cy2 markiert wird. Die beiden Proben und der IPS werden vermisch, isoelektrisch fokussiert und dann auf das 2D-Gel aufgetragen, wo sie gemeinsam gelelektrophoretisch getrennt werden. Beim anschließenden Scannen des Gels mit 3 verschiedenen Wellenlängen ergeben sich 3 verschiedene Gelbilder.



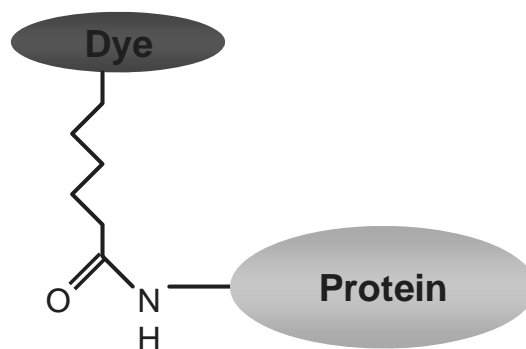
Quelle: Westermeier R. et al., Sample preparation for 2D PAGE. Methods in Molecular Biology, Humana Press

In diesem Experiment kam die Technik des „Minimal Labeling“ zur Anwendung. Die so genannten „Minimal Dyes“ haben eine NHS-Ester reaktive Gruppe, welche über eine Amid-Bindung kovalent an die Epsilon-Aminogruppe der Lysinreste gebunden wird (siehe Abb. 11). Dabei werden statistisch gesehen nur weniger als 5 % aller Moleküle eines Proteins und pro Molekül nur ein Lysinrest markiert. Die Markierung der Proteine ist ladungsneutral, weshalb die IEF unbeeinflusst bleibt. Die Masse aller Proteine erhöht sich um ca. 0,5 kDa, so dass auch die Laufeigenschaften des Proteins im 2D-Gel durch die Fluoreszenzmarkierung nicht merklich verändert werden.

**Abb. 11 Minimal Labeling**

- A. Kovalente Amid-Bindung (NHS-Ester) des Fluoreszenzfarbstoffes an ein Protein
- B. Es wird jeweils nur ein Lysin (K) pro Molekül markiert.
- C. Nur 1-2% aller Moleküle eines Proteins werden markiert.

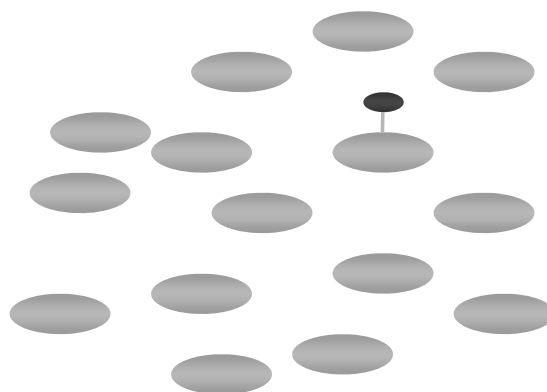
A



B



C



Quelle: Thomas Fröhlich, LAFUGA, Gen Zentrum Großhadern

#### 4.5.4.1. Material

“CyDye DIGE Fluor Cy2”

“CyDye DIGE Fluor Cy3”

“CyDye DIGE Fluor Cy5”

*N-N-Dimethylformamid (DMF)*<sup>6</sup>

*L-Lysin, 10 mM* (zum Stoppen der Labeling-Reaktion)

15 mg            L-Lysin<sup>16</sup>  
ad 10 ml        Aqua bidest.

Lagerung       -20° C

#### 4.5.4.2. Durchführung

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden laut Herstellerangaben in DMF rekonstituiert und bis zur weiteren Verwendung innerhalb einer Woche bei -20° C gelagert. Für das gesamte Experiment wurde ein IPS aus allen verwendeten Proben erstellt, welcher einmalig mit Cy2 nach Herstellerprotokoll gelabelt wurde. Dazu wurden 3,6 mg IPS bestehend aus je 150 µg Protein je Probe gepoolt und 1,5 mg davon nach Protokoll des Herstellers gelabelt. Anschließend wurden IPS-Aliquots a 50 µg erstellt und bei -80° C gelagert.

**Tab. 7 Planung DIGE-Experiment (Cy2 in weiß, Cy3 in grau, Cy5 in dunkelgrau)**

Für jedes Replikat wurden 6 Streifen fokussiert bzw. 6 2D-Gele angefertigt. Innerhalb eines Replikates gab es für jeden Entwicklungszeitpunkt drei technische Replikate, welche auf 3 verschiedenen Gelen mit jeweils einem weiteren Stadium aufgetrennt wurden. Nach drei biologischen Replikaten für jeden Entwicklungszeitpunkt erfolgte ein Farbstoffwechsel von Cy3 zu Cy5 und umgekehrt.

	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6
Replikat 1	ET 10	ET 10	ET 10	ET 18	ET 18	Tag 28
	ET 18	Tag 2	Tag 28	Tag 2	Tag 28	Tag 2
	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS
Replikat 2	ET 10	ET 10	ET 10	ET 18	ET 18	Tag 28
	ET 18	Tag 2	Tag 28	Tag 2	Tag 28	Tag 2
	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS
Replikat 3	ET 10	ET 10	ET 10	ET 18	ET 18	Tag 28
	ET 18	Tag 2	Tag 28	Tag 2	Tag 28	Tag 2
	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS
Replikat 4	ET 10	ET 10	ET 10	ET 18	ET 18	Tag 28
	ET 18	Tag 2	Tag 28	Tag 2	Tag 28	Tag 2
	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS
Replikat 5	ET 10	ET 10	ET 10	ET 18	ET 18	Tag 28
	ET 18	Tag 2	Tag 28	Tag 2	Tag 28	Tag 2
	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS
Replikat 6	ET 10	ET 10	ET 10	ET 18	ET 18	Tag 28
	ET 18	Tag 2	Tag 28	Tag 2	Tag 28	Tag 2
	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS	IPS

Die einzelnen Proben wurden nach oben stehender Tabelle (siehe Tab. 7) jeweils direkt vor der Fokussierung mit Cy3 und Cy5 nach Protokoll des Herstellers gelabelt, wobei an einem Tag jeweils ein biologisches Replikat von jedem der vier Entwicklungszeitpunkte gelabelt wurde und die Proben incl. IPS auf sechs Fokussierungstreifen verteilt wurden. Von jeder der 24 Proben wurden drei technische Replikate angefertigt, wobei darauf geachtet wurde, dass jeder Entwicklungszeitpunkt mit jedem weiteren Zeitpunkt innerhalb eines Replikates einmal auf einem Streifen zusammen fokussiert wurde. So wurden insgesamt 36 Streifen fokussiert und anschließend 36 2D-DIGE Gele angefertigt. Außerdem wurde für alle Entwicklungszeitpunkte ein so genannter „Dye Swap“ oder Farbstoff-Wechsel zwischen Cy3 und Cy5 nach der Hälfte aller Replikate durchgeführt.

#### **4.5.5. Scannen der analytischen Gele**

Die analytischen DIGE-Gele wurden direkt nach der Elektrophorese aus der Elektrophoresekammer entnommen und noch in den Glaskassetten mit dem „Typhoon 9400“-Scanner der Firma GE Healthcare gescannt. Dabei wurde jeder Farbstoff mit einer unterschiedlichen Wellenlänge angeregt, Cy2 mit 488 nm, Cy3 mit 532 nm und Cy5 mit 633 nm. Die Intensität der Scans, d.h. die Verstärkung des Signals am Photomultiplier erfolgte mit 550 V, die Auflösung betrug 100 µm Pixellänge. In der zugehörigen Software „Image Quant“ wurden die Gelbilder anschließend anhand der Regelmäßigkeit ihres Laufmusters beurteilt und unter den jeweils drei technischen Replikaten jeder Probe das beste Gelbild ausgewählt. Dieses wurde sodann auf das Areal mit der wesentlichen Information („Region of Interest“) zurechtgeschnitten („gecroppt“), d.h. Gebiete ohne Spots oder unregelmäßige Regionen im Randbereich wurden entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Grenzen reproduzierbar gesetzt wurden und damit beim Zuschneiden der Bilder ein wiederkehrendes Spotmuster erhalten blieb.

#### **4.5.6. Auswertung der 2D-Gele mittels „DeCyder 7.0“**

Nach dem Scannen der analytischen Gele und dem Zuschneiden der Gelbilder in „Image Quant“ wurden diese in „DeCyder 7.0“ geladen. „DeCyder“ ist ein Programm, welches mittels eines patentierten Algorithmus die Spotmuster verschiedener Proteinproben bezüglich ihrer Position und Intensität miteinander vergleicht. Über den auf allen Gelen enthaltenen internen Standard können alle Proteinproben eines Experiments miteinander verglichen werden, unabhängig davon, auf welchem Gel sie gelaufen sind. Darüber hinaus dient der IPS zur Normalisierung von Inter-Gel-Varianzen und zur Ermittlung der Abundanzveränderungen der einzelnen Spots, welche bezogen auf den Standard berechnet werden.

Das Programm besteht aus drei Modulen, der „Differential In-Gel Analysis“ (DIA), der „Biological Variation Analysis“ (BVA) und der „Extended Data Analysis“ (EDA). Im DIA-Modul erfolgt für jedes der drei Scanbilder eines Gels die Detektion der Proteinspots nach einem patentierten Algorithmus sowie deren Quantifizierung in Bezug auf den internen Standard. Alle erzeugten DIA-Dateien werden dann in das BVA-Modul geladen und dort prozessiert. Hier erfolgt die Zuordnung der einzelnen Spots eines so genannten Mastergels, des Gels mit den meisten detektierten Spots, zu den jeweiligen entsprechenden Spots auf allen anderen Gelbildern. Hiermit werden nun auch quantitative Vergleiche der Proteinexpression zwischen verschiedenen Gelen möglich. Sollten Spots innerhalb der verschiedenen Gele einander nicht korrekt zugeordnet worden sein, müssen diese manuell nachgearbeitet werden. Im EDA-Modul schließlich erfolgt die statistische Auswertung der Ergebnisse.

#### 4.5.6.1. Durchführung

Alle 36 zugeschnittenen Gelbilder, 24 für die Proben der sechs biologischen Replikate zu vier Entwicklungszeitpunkten und 12 für den IPS, wurden über den „Image Loader“ in „DeCyder 7.0“ geladen. Die Durchführung der einzelnen Module erfolgte laut Handbuch des Herstellers, wobei folgende Einstellungen vorgenommen wurden:

**Tab. 8 Parameter für Spot-Detektion (DIA)**

Parameter	Auswahl
Estimated number of spots	10,000
Exclude filter	volume 30,000

**Tab. 9 Statistische Parameter (BVA)**

Parameter	Auswahl
Type of statistical test	independent tests
Multiple Group Comparisons	One-Way-ANOVA
Group to group comparisons	Average Ratio, Student's t-test
False discovery rate (FDR) correction	Yes
Proteins of interest	proteins present in $\geq 36$ spot maps, One-Way-ANOVA value $\leq 0.01$

**Tab. 10 Statistische Parameter (EDA)**

Parameter	Auswahl
Protein filter	Protein present in $>70\%$ of spot maps
One-Way-ANOVA value	$\leq 0.0001$
Spot map filter	remove unassigned spot maps

#### 4.5.7. Coomassie-Färbung

Die präparativen Gele wurden direkt nach der Elektrophorese nach dem Protokoll unter Punkt 4.5.2 mit Coomassie gefärbt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gele in Entfärbelösung gelagert.

#### **4.5.8. Ausstechen der 2D-Gelspots**

Das Austechen der differentiellen Protein-Spots oder „Spot-Picken“ erfolgte mit Hilfe des „PROTEINEERspII“ Pick-Roboters der Firma Bruker Daltonics. Dies geschah unter Verwendung einer aus „DeCyder“ exportierten Liste aller als „Protein of Interest“ markierten, differentiell abundanten Spots in Form einer Textdatei, welche die Koordinaten dieser Spots im Gel, geordnet nach deren Intensität, enthielt. Zum Picken der Spots wurden vier präparative, Coomassie-gefärbte Gele von vier verschiedenen Entwicklungszeitpunkten verwendet und zusätzlich ein präparatives Gel mit Cy2-gelabeltem IPS ohne Coomassie-Färbung, bei welchem das Spot-Picken „blind“ anhand seines in den Pick-Roboter geladenen Gelbildes erfolgte.

##### **4.5.8.1. Material**

*„Digest Pro MS 96 well reaction plates“*

*Schwarzer Filzstift*

##### **4.5.8.2. Durchführung**

Die präparativen, Coomassie-gefärbten Gele wurden zunächst für 20 min in Aqua bidest. auf Originalgröße gequollen und in den Glasrahmen des in den Pick-Roboter integrierten Scanners überführt. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, keine Risse oder Luftblasen unter der Gel-Oberfläche zu erzeugen. Anschließend wurde das Gel über die „SPcontrol 3.1“ Software des Pick-Roboters eingescannt und die aus „DeCyder“ exportierte Pick-Liste importiert. Nach exakter manueller Ausrichtung der einzelnen Spots am eingescannten Gelbild erfolgte das automatisierte Ausstechen der einzelnen Spots und die Überführung der erhaltenen Gelstücke in so genannte „reaction plates“. Dabei handelt es sich um nummerierte 96-Lochplatten mit drei kleinen Löchern im Boden jeder Delle, welche für die Weiterverarbeitung der Spots im Verdau-Roboter benötigt werden. Hierin wurden die Spots bis zur weiteren Verwendung in Aqua bidest. bei 4° C gelagert.

Für das Picken des nicht Coomassie-gefärbten IPS-Gels wurde dieses ebenfalls 20 min in Aqua bidest. gequollen und dann in den Glasrahmen eingesetzt. Auf der Unterseite des Rahmens wurden mit schwarzem Filzstift fünf kleine, punktförmige Markierungen gesetzt, vier in jeder Ecke und eine in der Mitte des Gels. Dann wurde das Gel im Glasrahmen erneut mit dem „Typhoon 9400“ gescannt, wobei die Filzstift-Markierungen als hell fluoreszierende Punkte sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gelbild als „TIF“-Datei gespeichert und anstelle eines Coomassie-Scan-Bildes in die Scanner-Software des Pickers geladen. Nun wurde das Gel, ohne seine Position im Glasrahmen zu verändern, auf den Scanner des Pick-



Roboters gelegt und die Glasplatte mit dem Gel gescannt, so dass in diesem zweiten Bild nur die Filzstift-Markierungen sichtbar waren. Es erfolgte eine Kalibrierung des Scanners durch eine Ausrichtung der Markierungen im „TIF“-Bild des Typhoon-Scans an den Markierungen der Filzstift-Punkte im Scan-Bild des Pick-Roboters, um anschließend nach Importieren und Ausrichten der Pick-Liste das automatisierte Picken der Gel-Spots zu beginnen. Zur Kontrolle der Positionen der ausgestochenen Spots wurde das Gel anschließend noch einmal im „Typhoon 9400“ gescannt.

#### 4.5.9. Trypischer Verdau der 2D-Gelspots

Der tryptische Verdau der 2D-Gelspots erfolgte im „Digest Pro MS“-Roboter der Firma Intavis.

##### 4.5.9.1. Material

**„Digest Pro MS reagent tubes“, 30 ml**

**„Digest Pro MS 96 well collection plates“**

**0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)**

1 ml	TFA <sup>6</sup>
ad 1 L	„LiChrosolv“-Wasser

**Acetonitril (ACN)**

**Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), 50 mM**

2 g	$\text{NH}_4\text{HCO}_3$ <sup>13</sup>
ad 500 ml	„LiChrosolv“-Wasser

**Ammoniumhydrogencarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), 25mM**

1 g	$\text{NH}_4\text{HCO}_3$ <sup>13</sup>
ad 500 ml	„LiChrosolv“-Wasser

**5 % Ameisensäure**

50 ml	FA <sup>6</sup>
ad 1 L	„LiChrosolv“-Wasser

**Porcine Trypsin-Lösung (1 µg/µl)**

20 µg	Trypsin-Lyophilisat <sup>11</sup>
20 µl	Trypsin-Resuspension-Puffer <sup>11</sup>

**HCl, 1 mM**

110 µl	HCl <sup>14</sup> (25%)
ad 1 L	„LiChrosolv“-Wasser

**Porcine Trypsin-Lösung in 1mM HCl**

12,5 µl	Porcine Trypsin-Lösung (1 µg/µl)
ad 1 ml	1 mM HCl

**Aluminiumfolie**

#### 4.5.9.2. Durchführung

Nach Protokoll des Herstellers wurden die unterschiedlichen Lösungen in 30 ml „Digest Pro MS reagent tubes“ mit kreisrunden Aussparungen im Deckel in die dafür vorgesehenen Halterungen überführt. Anschließend wurde jeweils eine „reaction plate“ mit ausgestochenen 2D-Gel-Stücken in einen in das Gerät integrierten thermostatischen Halter eingesetzt und eine leere „collection plate“, eine dazu passende 96-Loch-Platte ohne Löcher im Well-Boden, darunter befestigt. Nach Einsetzen der für den Verdau benötigten Roboter-Nadel wurde das Programm „DIGEST\_M“ über Nacht gestartet und am nächsten Morgen konnte die „collection plate“, in deren Dellem sich nun die verdauten Peptidlösungen der einzelnen Spots befanden, entnommen, in Aluminiumfolie verpackt und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert werden.

#### 4.5.10. Aufreinigung und Spotten der Peptide auf das MALDI-Target

Bei der Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation (MALDI) handelt es sich – neben der bereits erläuterten Elektrospray-Ionisation (ESI) - um ein weiteres Verfahren zur Ionisation von Peptiden. Dabei werden die Peptide unter Laserbeschuss mit Hilfe einer Matrix auf einem festen Träger, dem MALDI-Target, ionisiert (siehe Abb. 12). Hierfür werden die Peptide zunächst in eine Matrixsubstanz eingebettet, wobei ein Überschuss an Matrix-Molekülen gegenüber den Analyt-Molekülen herrscht. Die Matrix bewirkt bei Beschuss durch den Laser die Verdampfung und Ionisation der Peptide, indem sie das Laserlicht absorbiert und die Energie auf die Analyt-Moleküle überträgt. Der Analyt wird dabei ionisiert und aus der Matrix desorbiert und gelangt so ins Massenspektrometer.

Die jeweils ersten 96 ausgestochenen 2D-Gelspots eines präparativen Gels und damit die Spots mit der höchsten Protein-Intensität, wurden für die Analysen im MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer vorbereitet. Dazu gehörten die Aufreinigung und Konzentration der Peptidlösungen über so genannte „ZipTips“, Pipettenspitzen mit einer eingebetteten chromatographischen Silica-Matrix mit C18-Ketten, sowie das Aufbringen der gereinigten Peptide auf das MALDI-Target.

##### 4.5.10.1. Material

***„Digest Pro MS reagent tubes“, 10 ml, 5 ml und 2 ml***

***Acetonitril***

***0,1 % Trifluoressigsäure***

1 ml	TFA <sup>6</sup>
ad 1 L	„LiChrosolv“ <sup>8</sup> -Wasser

**5 % Ameisensäure**

50 ml FA<sup>6</sup>  
ad 1 L „LiChrosolv“<sup>8</sup>-Wasser

**65 % ACN in 0,1 % TFA**

65 ml ACN<sup>8</sup>  
100 µl TFA<sup>6</sup>  
ad 100 ml „LiChrosolv“<sup>8</sup>-Wasser

**MALDI-Matrix**

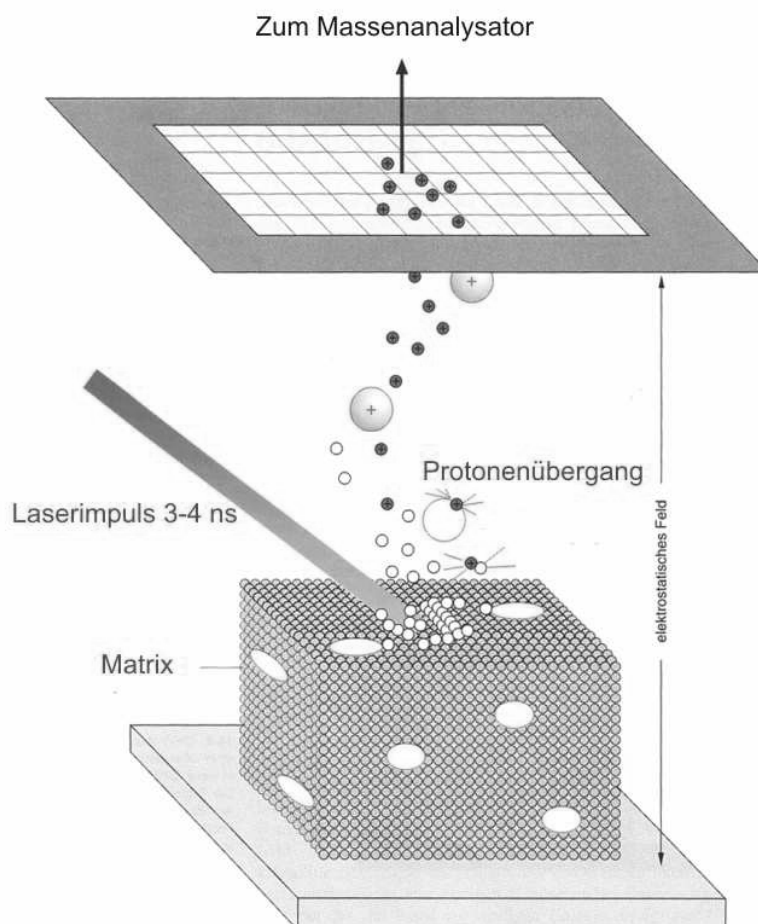
5 mg  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizimtsäure<sup>4</sup>  
ad 1 ml 65 % ACN in 0,1 % TFA

**10 % SDS**

10 g SDS<sup>15</sup>  
ad 100 ml Aqua bidest.

**„pol“- Metallpflege**

„Zip Tips  $\mu$ -C18“, Porengröße: 200 Å

**Aluminiumfolie****Abb. 12 MALDI-Ionisierung**

Dargestellt sind die Peptide (große Kugeln), welche in die Matrixsubstanz (kleine Kügelchen) eingebettet sind.

Peptide und Matrixsubstanz sind auf ein MALDI-Target aufgebracht.

Durch einen Laserimpuls wird die Ionisation der Peptide ausgelöst. Sie werden aus der Matrix herausgelöst und gelangen in den Massenanalysator.

#### **4.5.10.2. Durchführung**

Die Aufreinigung der verdauten Peptidlösungen der einzelnen 2D-Gel-Spots sowie das Aufbringen der gereinigten Peptidlösungen auf das MALDI-Target erfolgte ebenfalls im „Digest Pro MS“-Roboter der Firma Intavis. Dazu wurden alle oben genannten Lösungen in „Digest Pro MS reagent tubes“ in das Gerät eingesetzt, anschließend die Peptidlösungen in „reaction plate“ aufgetaut und dieses, zum Schutz vor Verdunstung mit einer Aluminiumfolie bedeckt, in die dafür vorgesehene Halterung überführt. Anschließend wurde das MALDI-Target zweimal sorgfältig mit SDS gewaschen, mit Metallpaste poliert und in den Target-Halter eingesetzt. Nach Einsetzen von 96 „ZipTip“-Pipettenspitzen in den dafür vorgesehenen Halter, und Befestigung der MALDI-Roboternadel wurde das Programm „ZipTip\_M4“ über Nacht gestartet. Am nächsten Morgen wurde das MALDI-Target mit den darauf getrockneten Spots der Peptid-Matrix-Lösung entnommen und direkt zur Analyse in das MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer eingesetzt.

#### **4.5.11. Identifizierung der Proteine**

Zur Identifikation der in den 2D-Gel-Spots enthaltenen Proteine wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet, einmal die Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisations Tandem Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF/TOF) und zum zweiten die schon bei den qualitativen Analysen verwendete Liquid Chromatographie Tandem Massenspektrometrie LC-MS/MS.

##### **4.5.11.1. MALDI-TOF/TOF**

Bei der Tandem Time of Flight Massenspektrometrie (TOF/TOF), welche häufig in Kombination mit MALDI-Ionisierungsquellen eingesetzt wird, werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und es wird die Flugzeit der Ionen in einem vakuumierten Flugrohr gemessen (siehe Abb. 13). Dabei treffen große Ionen mit einem großen Masse-zu-Ladungs-Verhältnis später auf dem Ionendetektor auf als kleine Ionen. Auch hier sind Tandem MS-Analysen möglich, indem vorselektierte Peptidionen in einer so genannten „Collision Cell“ mit Luftmolekülen zur Kollision gebracht werden und in charakterische Fragmente zerbrechen.

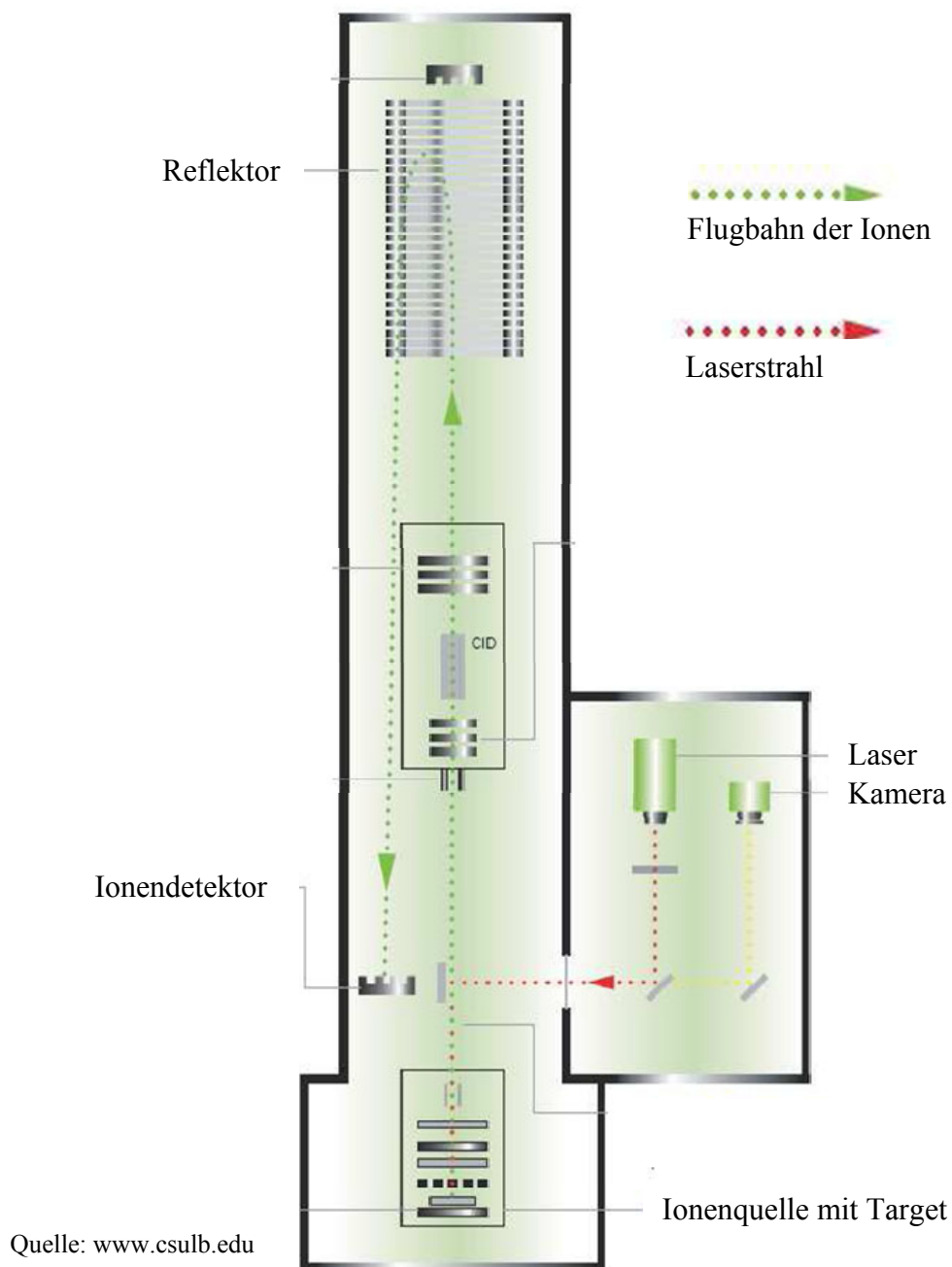
#### **Durchführung**

Die auf das MALDI-Target aufgebrachten Peptide wurden im „4800 MALDI TOF/TOF Analyzer“ der Firma Applied Biosystems analysiert. Der Beschuss des MALDI-Targets erfolgte dabei mit einem Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (Nd:YAG-Laser) bei 355 nm Wellenlänge und einer Laserintensität von 3500 auf der Geräte-internen

Scala. Pro Spot wurden jeweils 1600 Laser-Schüsse für die MS-Analysen bzw. 500 Schüsse für die MS/MS-Analysen ausgeführt, als Kollisionsgas wurde Luft verwendet. Anschließend wurden die MS/MS Spektren mit „MASCOT Search“ gegen die IPI-chicken-Datenbank gesucht.

**Abb. 13 Schema des 4800 MALDI-TOF/TOF-Gerätes**

Dargestellt ist der schematische Aufbau des 4800 MALDI-TOF/TOF-Gerätes, unten die Ionenquelle mit dem MALDI-Target, rechts angeordnet der Laser zum Beschuss des MALDI-Targets sowie eine Kamera zur Kontrolle der Laserausrichtung. In rot dargestellt ist der Laserstrahl in Richtung auf das MALDI-Target, in grün die Flugbahn der Ionen, welche im Flugrohr nach oben fliegen, durch den Reflektor in die entgegengesetzte Richtung geleitet werden und dann auf dem Ionendetektor auftreffen. Die CID-Einheit in der Mitte des Gerätes (CID = Collision Induced Dissociation) wird für Tandem-MS-Analysen verwendet.



#### 4.5.11.2. LC-MS-MS

Die schwächeren 2D-Gelspots wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Zunächst wurden die Analysen wie zuvor schon bei den qualitativen Identifizierungen über die nano-HPLC-Anlage „nano LC ultra“ der Firma Eksigent und das „Finnigan LTQ“- Massenspektrometer von Thermo Scientific durchgeführt. Die dabei nicht identifizierten Spots wurden in einem zweiten Durchlauf mittels der „Ettan MDLC“, einer nano-HPLC-Anlage der Firma Amersham/GE, gekoppelt an die „LTQ Orbitrap XL“, einem höchst sensitiven Massenspektrometer von Thermo Scientific, gemessen. Letzteres enthält als Hybridinstrument zusätzlich zu einer linearen Ionenfalle auch eine spindelförmige Falle.

#### Material

##### **0,1 % Ameisensäure (Formic Acid, FA)**

1 ml	FA <sup>6</sup>
ad 1 L	„LiChrosolv“ <sup>8</sup> (Wasser für Chromatographie)

##### **84 % Acetonitril in 0,1 % FA**

840 ml	ACN <sup>8</sup>
1 ml	FA <sup>6</sup>
ad 1 L	„LiChrosolv“ <sup>8</sup> (Wasser für Chromatographie)

##### **LC-Glas-Probenröhrchen, 1,5 ml**

##### **„C18 PepMap100“, C18-Trappingsäule**

(Partikelgröße: 5 µm, 100 Å, Säuleninnendurchmesser: 300 µm, Säulenlänge: 50 mm)

##### **„Reposil-Pur-C18-AQ“, C18-Trennsäule**

(Partikelgröße: 3 µm, 100 Å, Säuleninnendurchmesser: 75 µm, Säulenlänge: 150 mm)

#### Durchführung

Die Proben wurden im „collection plate“ aufgetaut. Für die Analysen in der „Finnigan LTQ“ wurden jeweils 10 µl der verdauten Peptidlösung in 0,1 % FA entnommen und direkt in LC-Probenröhrchen überführt. Anschließend wurden die einzelnen Peptidfraktionen über einen 50-minütigen Elutionsgradienten von 0-84 % Acetonitril in 0,1 % FA aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert.

Für die Analysen in der „LTQ Orbitrap XL“ wurden ebenfalls je 10 µl Peptidlösung entnommen, diese jeweils in ein LC-Probenröhrchen überführt und mit 0,1 % FA auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt. Die Analysen erfolgten hier ebenfalls über einen 50 minütigen Elutionsgradienten von 0-84 % Acetonitril in 0,1 % FA.

Anschließend wurden die in den Massenspektrometern erzeugten „RAW“-Dateien über „MASCOT Search“ gegen die IPI-chicken-Datenbank (Version 3.6) gesucht.

#### **4.5.12. Ermittlung von homologen Proteinen**

Ein spezielles Problem bei der Arbeit mit Datenbanken, welche sich auf Hühnersequenzen beziehen, ist, dass weit weniger der sequenzierten Bereiche als beispielsweise bei Mensch oder Maus auch annotiert sind. Proteine, welche in der IPI-chicken-Datenbank bisher nicht näher charakterisiert waren, und lediglich als Nummer ohne weitere Annotation (Name, Funktion, etc.) gelistet waren, wurden über Homologie-Suche nach nahe verwandten Proteinen anderer Spezies genauer untersucht. Auf diese Weise konnten zusätzliche Informationen über das betreffende Protein gewonnen werden, wenn auch mit der Einschränkung, dass dieses noch nicht beim Huhn, wohl aber bei anderen Arten beschrieben ist. Zur Ermittlung der Homologe wurde die „NCBI-BlastP“-Suchmaschine des „European Bioinformatics Institute“ (EBI) verwendet. Die Ermittlung von homologen Proteinen wurde durch Festsetzung des „E-Values“ (engl.: Expected Value; erwarteter Wert der zufälligen Treffer) auf  $< 0,001$  begrenzt.

#### **4.5.13. Gene Ontology**

Die Durchführung der genontologischen Analysen erfolgte wie unter 4.4.8 beschrieben.

#### **4.5.14. Pathway-Analysen**

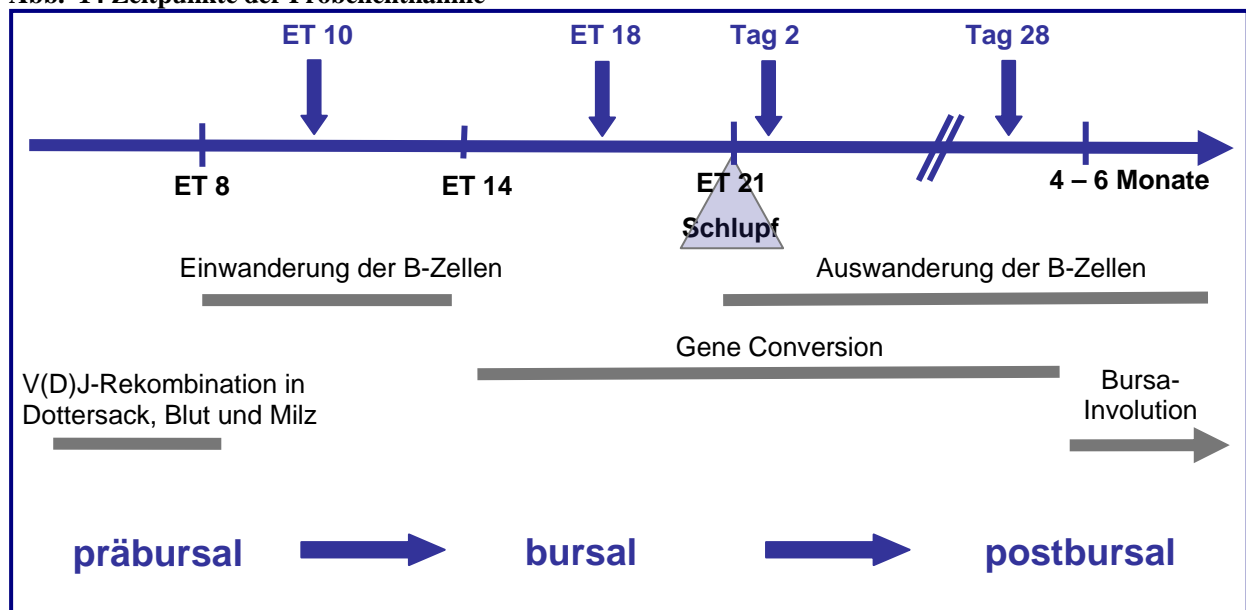
Über „DAVID“, ein Programm des „National Institute of Allergy and Infectious Diseases“ (NIAID) zur Datenanalyse von transkriptomischen und proteomischen Daten, wurde eine funktionelle Annotation der differentiellen Proteine der vier Bursastadien unter gleichzeitiger Auswertung ihrer Anreicherung in bestimmten Pathways („Gene enrichment analysis“) durchgeführt. Zur Durchführung der Analysen wurde eine Liste der identifizierten differentiellen Proteine in das Programm geladen und die Pathways ermittelt, in denen diese Proteine vermehrt vorkommen. Dabei wurden Proteine als „in einem Pathways angereichert“ betrachtet, wenn die Anzahl der in diesem Pathway enthaltenen Proteine aus der geladenen Proteinliste in Bezug auf die Gesamtzahl der Listenproteine ein höheres Verhältnis ergab als das Verhältnis aller Listenproteine zum Gesamtgenom. So wurde sichergestellt, dass die angereicherten Proteine mit einer höheren Wahrscheinlichkeit im jeweiligen Pathway vorkamen als der Wahrscheinlichkeit, mit der ein beliebiges Protein des Hühner-Gesamtgenoms zu diesem Pathway gehört. Zur Ermittlung der Signifikanz eines betroffenen Pathways wird in „DAVID“ ein modifizierter Fisher-p-Wert, der so genannte „EASE“ verwendet, welcher von 0 bis 1 reicht, wobei 0 die perfekte Anreicherung von Genen eines Pathways bedeutet. Der „EASE“ wurde laut Empfehlung der „DAVID“-Kommission bei  $p < 0,1$  gesetzt. Ebenso wurde eine Grenze für die Anzahl der einem Pathway zugeordneten Proteine bestimmt, welche bei mindestens zwei Proteinen lag.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. Festlegung der Probenentnahmezeitpunkte

Nach Studium der einschlägigen Literatur über die embryonale Entwicklung der Bursa Fabricii beim Haushuhn wurden die folgenden vier Zeitpunkte zur Probenentnahme festgelegt (siehe Abb. 14): Embryonaltag 10 (ET10) als Probe für die Einwanderung der B-Zellen in die Bursaanlage zwischen ET8 und ET14, jedoch noch vor Beginn der Gene Conversion des B-Zell-Rezeptors, Embryonaltag 18 (ET18) für eine Probe, bei der die Einwanderung der B-Zellen bereits abgeschlossen ist, jedoch noch vor Beginn ihrer Emigration aus dem Organ und während der Gene Conversion des B-Zell-Rezeptors, Tag 2 nach dem Schlupf für die Emigration der B-Zellen aus dem noch unreifen Organ und schließlich Tag 28 nach dem Schlupf, zu dem die B-Zellen weiter aus der Bursa auswandern, nun jedoch aus einem reifen Organ mit Unterteilung der Bursafollikel in Rinde und Mark.

Abb. 14 Zeitpunkte der Probenentnahme



### 5.2. Qualitative Proteomik

Vor Durchführung der differentiellen Proteomanalysen zu den vier Entwicklungszeitpunkten wurde zunächst für jedes Stadium ein qualitatives Protein-Profil erstellt. Qualitative Proteinanalysen bieten den Vorteil, die Vielzahl der in einer biologischen Probe enthaltenen Proteine möglichst umfassend zu analysieren, während gelbasierte quantitative Analysen vor allem Aufschluss über Veränderungen im Protein-Expressionsprofil der einzelnen Zeitpunkte



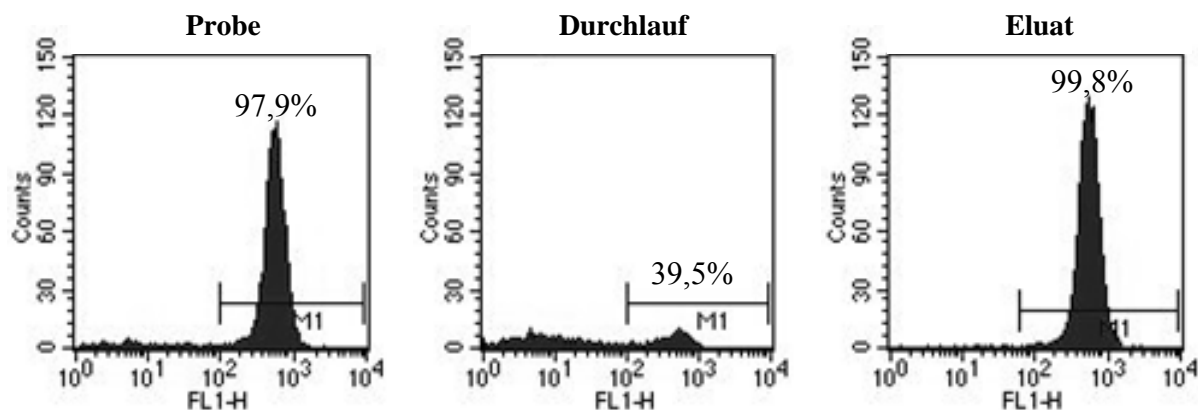
geben, im Hinblick auf die Anzahl der identifizierten Proteine jedoch den qualitativen Analysen unterlegen sind.

### 5.2.1. B-Zell-Separation mittels Magnetic Cell Sorting (MACS)

In der Bursa Fabricii befinden sich zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten unterschiedliche Anteile an B-Zellen. Während die Bursa an ET10 neben Stromazellen nur ungefähr 10 % B-Zellen enthält, besteht eine reife Bursa an Tag 28 nach dem Schlupf zu über 95 % aus B-Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass die in der Bursa enthaltene B-Zell-Zahl einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Veränderungen im Gesamt-Bursa-Proteom der verschiedenen Zeitpunkte hat. Daher wurde zusätzlich zu den Analysen der Bursastadien eine qualitative Analyse des bursalen B-Zell-Proteoms durchgeführt. Hierzu wurde die Bursa eines Kükens kurz nach dem Schlupf entnommen, die B-Zellen wie unter 4.2.2 beschrieben präpariert und mittels MACS (siehe 4.2.3) aus der bursalen Mischzellpopulation aufgereinigt. Dies führte zu einer Ausbeute von  $2 \times 10^7$  B-Zellen, deren Reinheit im Durchflußzytometer mit 99,8 % bestimmt wurde (siehe Abb. 15).

#### Abb. 15 Aufreinigung der B-Zellen mittels MACS

Dargestellt ist die Analyse der 3 MACS-Fractionen im Durchflußzytometer, je ein Histogramm für die Probe vor Aufreinigung („Probe“), eines für die Negativfraktion („Durchlauf“) und eines für die Positivfraktion („Eluat“). Es ist jeweils die Zellzahl (Ordinate) gegen die Fluoreszenz (Abszisse) aufgetragen. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die prozentualen Anteile der B-Zellen an der Gesamtzellzahl.



### 5.2.2. Identifizierung der Proteine

Die qualitativen Analysen der einzelnen Bursastadien sowie der B-Zellprobe erfolgten durch chromatographische Auftrennung und anschließende massenspektrometrische Analysen wie unter 4.4 beschrieben. Dabei wurden die Proben zunächst mittels eindimensionaler Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen anschließend tryptisch verdaut. Die so entstandenen Peptidgemische wurden daraufhin unter Zuhilfenahme der Flüssigchromatographie aufgetrennt, wodurch einzelne Peptidfraktionen zeitversetzt in ein Massenspektrometer geleitet und deren Peptidmassen dort bestimmt

wurden. Zur Identifikation der Proteine wurde „MASCOT Search“ wie unter 4.4.6 beschrieben verwendet. Anschließend wurden die Daten in „Scaffold“ einer statistischen Auswertung unterzogen (siehe 4.4.7), welche ergab, dass die Proteine mit mindestens einem proteinspezifischen Peptid und einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 99 % Richtigkeit ( $\text{FDR} < 1\%$ ) identifiziert wurden.

In den Bursalysaten der einzelnen Entwicklungszeitpunkte konnten zwischen 1152 und 1392 Proteine identifiziert werden. Bei zu erwartenden Werten von ca. 1000 identifizierten Proteinen pro 50 µg eingesetztem Probenmaterial ist dieses Ergebnis als gut zu erachten. Weiterhin ermöglichen die annähernd gleich hohen Proteinzahlen vergleichende Analysen zwischen den einzelnen Stadien (siehe Abb. 16, A und B).

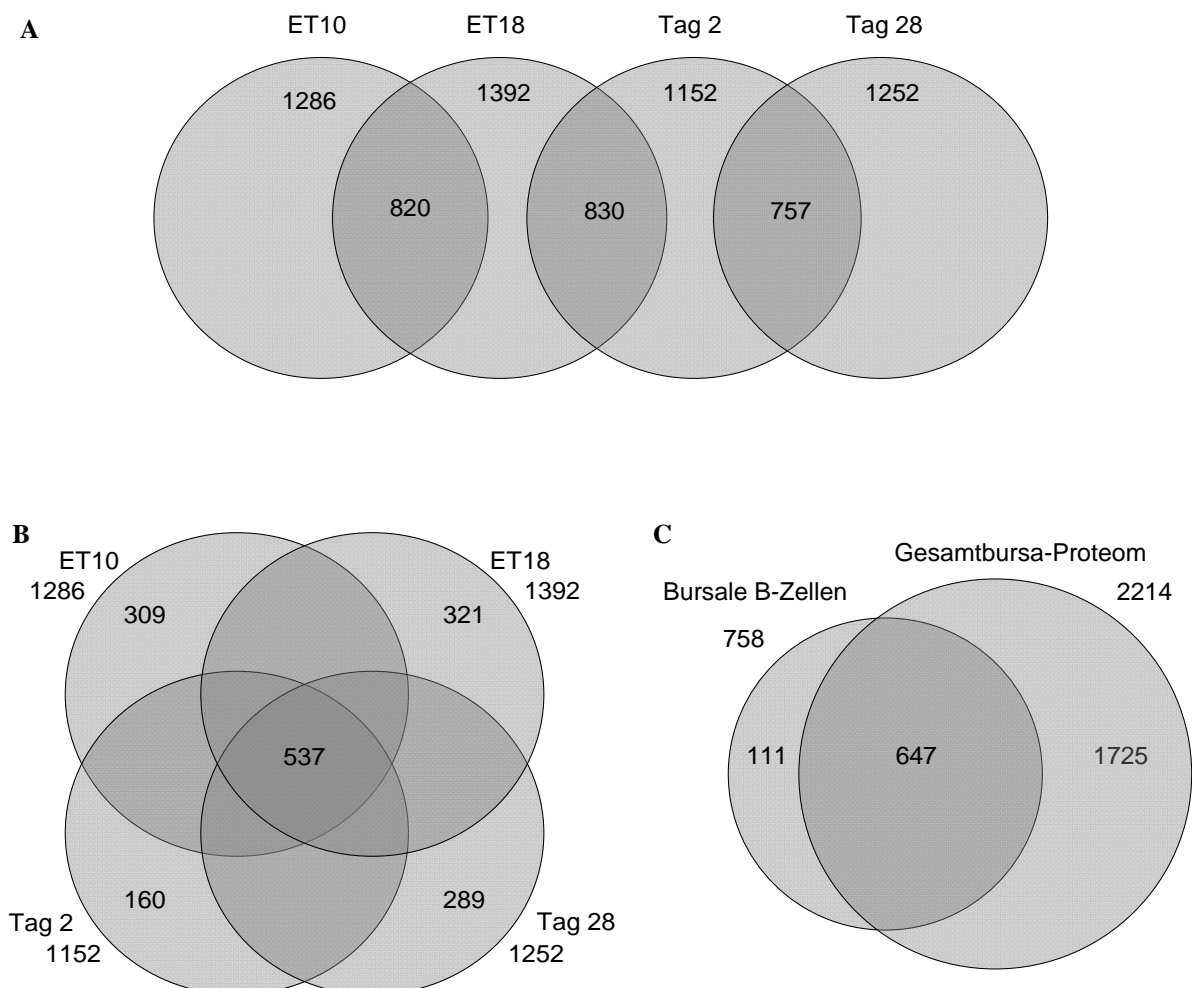
**Abb. 16 Vergleich der Proteome der bursalen Entwicklungsstadien sowie der B-Zellen**

Dargestellt sind Venn-Diagramme der identifizierten Proteine.

A: Vergleich aufeinander folgender Entwicklungsstadien

B: Vergleich aller Entwicklungsstadien untereinander

C: Vergleich B-Zell-Proteom und Gesamt-Bursa-Proteom



Dabei wurde festgestellt, dass nachfolgende Zeitpunkte sich in ca. 800 Proteinen überschneiden, während alle Stadien zusammen genommen nur ca. 537 Proteine gemeinsam haben. Diese Überschneidungen entstehen v.a. durch Proteine, welche für allgemeine Struktur- und Stoffwechselvorgänge in jeder Zelle verantwortlich sind. Ein Großteil dieser Proteine dient metabolischen Prozessen, wie beispielsweise Enzyme des Zucker- und Fettstoffwechsels, der Proteolyse, RNA-Prozessierung oder Translation. Weiterhin wurden Proteine gefunden, welche Bausteine für bestimmte Zellbestandteile jeder Zelle darstellen, wie beispielsweise für den Proteasom-Komplex oder Mitochondrien. Ebenso waren eine Vielzahl von Bindungsproteinen unter den in allen Stadien gefundenen Proteinen, hier v.a. Protein- und Nukleotid-bindende Proteine, sowie verschiedene Proteine mit katalytischer Aktivität, darunter v.a. Hydrolasen.

Von den insgesamt 2214 verschiedenen, in dieser Arbeit identifizierten Proteinen wurden 2062 beim Huhn erstmals auf Proteinebene detektiert, d.h. diese Proteine sind bisher lediglich durch die Ableitung transkriptomischer Daten oder aufgrund datenbankbasierter Sequenzvergleiche von DNA oder mRNA mit anderen Spezies als homologe Proteine in der UniProt-Datenbank gelistet.

Aus dem durch MACS aufgereinigten B-Zell-Lysat wurden insgesamt 758 Proteine identifiziert, von denen 684 im Huhn noch nicht auf Proteinebene beschrieben sind. In einer vergleichenden Analyse mit dem Gesamtbursa-Proteom (siehe Abb. 16, C) stimmen diese zu einem großen Teil (647 Proteine) mit denen der Bursastadien überein, während sich nur 111 Proteine der B-Zellen nicht in den Bursaproben wiederfinden lassen. In der Analyse des Gesamtbursa-Proteoms wurden hingegen 1725 Proteine identifiziert, welche nicht in der B-Zell-Probe nachweisbar waren. Diese Proteine haben damit zumindest eine höhere Wahrscheinlichkeit, aus dem Bursastroma statt aus den B-Zellen selbst zu stammen, ein Kriterium, welches in die spätere Kandidatenselektion mit einbezogen wurde.

Übersichtstabellen über die identifizierten Proteine aus der Bursa sowie der B-Zellen finden sich in der CD-ROM im Anhang (Tab. CD1 und CD2).

### **5.2.3. Spectral Counting**

Im Zuge der Scaffold-Analyse der identifizierten Proteine (siehe 4.4.7), wurde auch ein so genannter „Spectral Count“ durchgeführt. „Spectral Counting“ ist eine Methode zur relativen Quantifizierung MS-basierter Proteindaten. Dabei kann aus der Anzahl der gemessenen MS/MS-Peptidspektren, welche einem bestimmten Protein in verschiedenen Proben zugeordnet werden, das Abundanzverhältnis dieses Proteins zwischen den einzelnen Proben

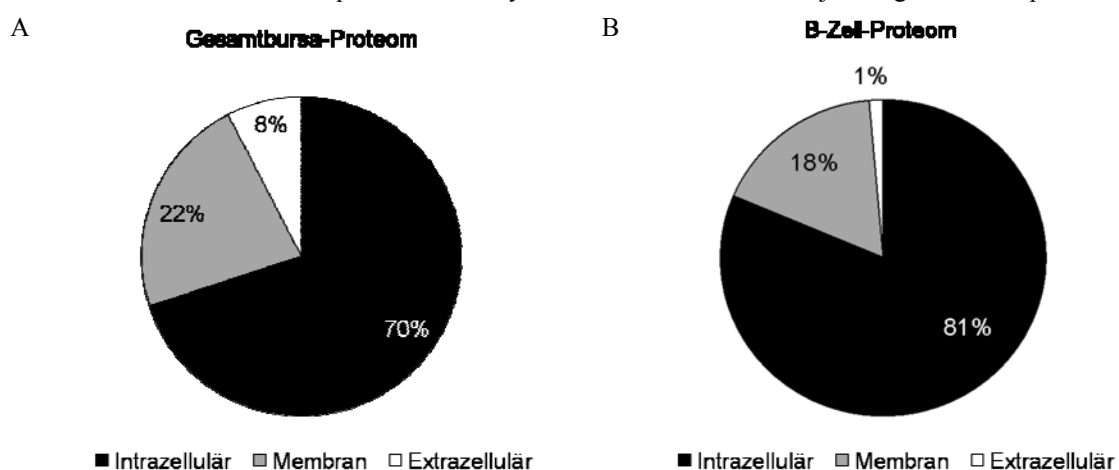
errechnet werden. Diese Methode ist allerdings auf die Anwendung von Datensätzen mit reaktiv hohen Abundanzänderungen oder „fold changes“ zwischen den einzelnen Proben begrenzt, bzw. sind niedrige quantitative Veränderungen nur durch eine hohe Anzahl an Peptidspektren der jeweiligen Proteine erfassbar. So sind beispielsweise für die Detektion eines „3-fold-changes“ mindestens vier Peptidspektren erforderlich, während es für eine verlässliche Aussage über einen „2-fold change“ bereits 15 Peptidspektren sind [89]. In diesem Experiment wurde innerhalb jedes Entwicklungszeitpunktes die Anzahl der gemessenen Peptidspektren für jedes Protein bestimmt und auf die Gesamtzahl aller gemessenen Peptidspektren normalisiert (siehe Tab. 3 auf CD-ROM). Die so erhaltenen Daten bildeten die Grundlage für einen späteren Vergleich mit den Daten der gelbasierten quantitativen Proteomanalyse. Auf die Ergebnisse des Vergleichs wird unter 5.4 eingegangen.

#### 5.2.4. Gene Ontology

Um die qualitativen Daten weiter zu untersuchen, wurden die identifizierten Proteine im Folgenden verschiedenen genontologischen Gruppen zugeordnet (siehe 4.4.8). Zunächst wurde eine Einteilung der Proteine nach ihrer Zugehörigkeit zu den zellulären Bestandteilen „Intrazellulär“, „Membran“ und „Extrazellulär“ vorgenommen (siehe Abb. 17). Dabei zeigte sich, dass sowohl im Gesamtbursa-Proteom als auch in der B-Zell-Probe v.a. intrazelluläre Proteine gefunden wurden. Membranständige Proteine wurden in allen Proben zu ca. 20 % identifiziert und extrazelluläre Proteine fanden sich zu einem geringen Anteil von 8 % des Gesamtbursa-Proteoms; bei den aufgereinigten B-Zellen waren es lediglich 1 %.

**Abb. 17 Gene Ontology: Zellulärer Bestandteil**

Prozentuale Anteile der mittels qualitativer Analysen ermittelten Proteine am jeweiligen Zellkompartiment.

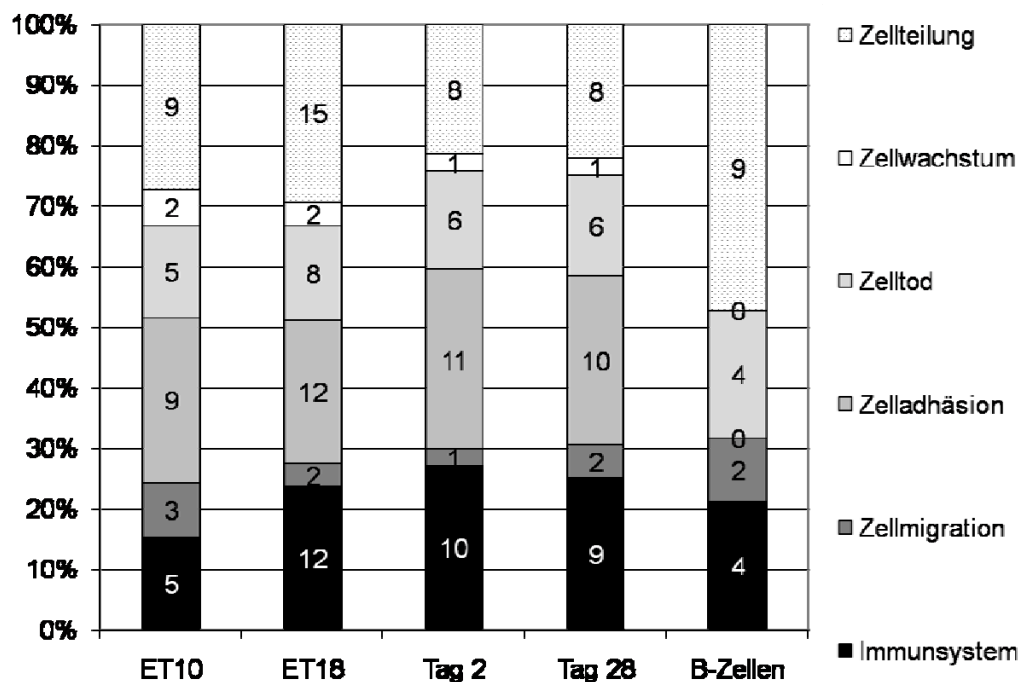


Im Hinblick auf die der Arbeit zugrunde liegende Fragestellung besonders interessant waren die genontologischen Gruppen „Zellteilung“, „Zellwachstum“, „Zelltod“, „Zelladhäsion“, „Zellmigration“ und „Immunsystem“, deren zugehörige Proteine im Anhang aufgeführt sind

(siehe Tab. CD4 – CD9). Abb. 18 zeigt die prozentualen Anteile der jeweiligen biologischen Prozesse innerhalb dieser Gruppen im Vergleich zwischen den Entwicklungsstadien sowie für die B-Zellen. Hierbei wird deutlich, dass Proteine, welche in Zusammenhang mit Zellwachstum gebracht werden, v.a. zu den frühen Zeitpunkten zu finden sind, während Proteine, die eine Rolle für das Immunsystem spielen, eher zu späteren Entwicklungszeitpunkten in Erscheinung treten. Weiterhin fällt auf, dass in der B-Zell-Probe im Gegensatz zu allen Entwicklungszeitpunkten keinerlei Proteine für Zelladhäsion oder Zellwachstum gefunden wurden, dafür aber der Anteil an Proteinen, welche der Zellteilung zugeordnet werden, besonders hoch ist. Für Zellmigration verantwortliche Proteine zeigen relativ zur Gesamtzahl v.a. an ET10 sowie in den B-Zellen erhöhte Werte.

**Abb. 18 Gene Ontology: Biologische Prozesse**

Dargestellt sind die sich verändernden Anteile der mittels qualitativer Analysen ermittelten Proteine an den genontologischen Klassen Zellteilung, Zellwachstum, Zelltod, Zelladhäsion, Zellmotilität und Immunsystem im Vergleich zwischen den vier Entwicklungszeitpunkten sowie für die B-Zellen. Dabei wurde die Summe dieser 6 Prozesse jeweils auf 100 % gesetzt. Die Zahlen in den Balken entsprechen der absoluten Anzahl der Proteine.



### 5.3. Quantitative Proteomik

Um die Protein-Expressionsprofile der Bursa Fabricii zu den vier gewählten Entwicklungszeitpunkten quantitativ zu vergleichen und damit Hinweise auf mögliche Faktoren für die B-Zellreifung und -funktion zu erhalten, wurde eine differentielle Proteomanalyse mittels 2D-DIGE-Technologie durchgeführt, wie unter 4.4 beschrieben. Dabei wurden zunächst alle entnommenen Proben im Sinne einer Qualitätsprüfung einzeln auf 2D-Gelen aufgetrennt, welche anschließend mit Silber gefärbt wurden. Danach erfolgte die Erstellung der analytischen 2D-DIGE-Gele für die differentielle Proteomanalyse und abschließend wurden von jedem Zeitpunkt sogenannte präparative Gele mit einem hohen Proteingehalt angefertigt, welche anschließend mit Coomassie gefärbt und für das Ausstechen der Proteinspots zu deren Identifizierung verwendet wurden. Vor Durchführung der eigentlichen Experimente wurden die Techniken zur Erstellung der 2D-Gele im Rahmen von Vorversuchen optimiert und an die Eigenschaften des Probenmaterials adaptiert.

#### 5.3.1. Optimierung der isoelektrischen Fokussierung

Bei ersten Vorversuchen der isoelektrischen Fokussierung von Bursalysaten stellte sich nach anschließender Gelelektrophorese und Silberfärbung heraus, daß im oberen linken Bereich der Gelbilder horizontale Streifen statt einzeln aufgetrennte Spots zu sehen waren (siehe Abb. 19 A). Dies spricht für eine schlechte Auftrennung der Proteine im sauren Bereich des Fokussierungstreifens. Um eine Verbesserung der Fokussierung zu erreichen, wurde die Probenmenge von 100 µg auf 50 µg pro Streifen reduziert, sowie ein zusätzlicher Schritt (150 V, 4 h) zu Beginn des Fokussierungsprotokolls eingefügt, welcher ein langsames Einlaufen der Proteine in den Fokussierungstreifen bei initial niedrigerer Spannung erlaubt. Dies führte zu einer sichtbaren Reduktion der Horizontalstreifen. Ein weiteres Problem, welches speziell bei der Methodik des „Cup Loading“ (siehe 4.5.1) in Erscheinung trat, waren prominente vertikale Streifen im Gel, ausgehend von der Stelle des Probenauftrags auf den Fokussierungstreifen mit Hilfe des Proben-Cups (siehe Abb. 19 B). Als Lösungsansatz für dieses Problem wurde das Gesamtvolumen der Proben vor dem „Cup Loading“ vergrößert, indem diese mit einem 1:1-Mix aus 2D-DIGE-Lysepuffer und Probenpuffer auf 100 µl aufgefüllt wurden. Das Ergebnis der Optimierungsversuche ist in Abb. 19 C dargestellt.

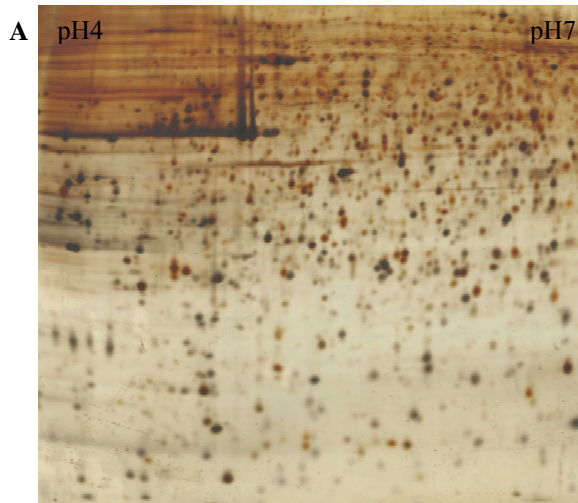
**Abb. 19 IEF - Vorversuche zu Proteinmenge, Probenvolumen und Spannung**

Dargestellt sind drei 2D-Gele mit aufgetrenntem Bursalysat von ET18 in der Silberfärbung

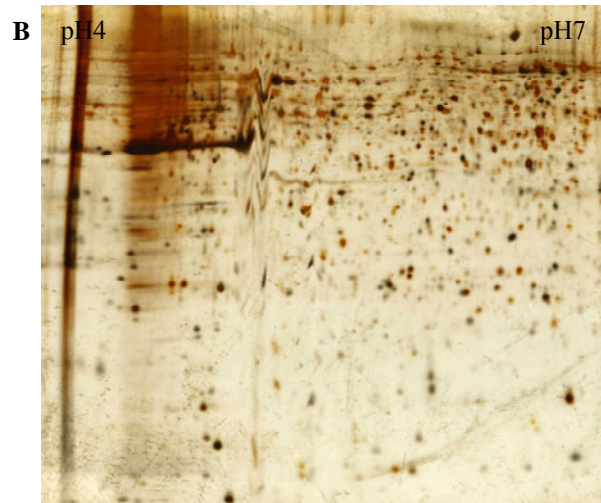
A: Horizontalstreifen im sauren oberen Bereich

B: Horizontalstreifen im sauren Bereich und Vertikalstreifen am linken Bildrand

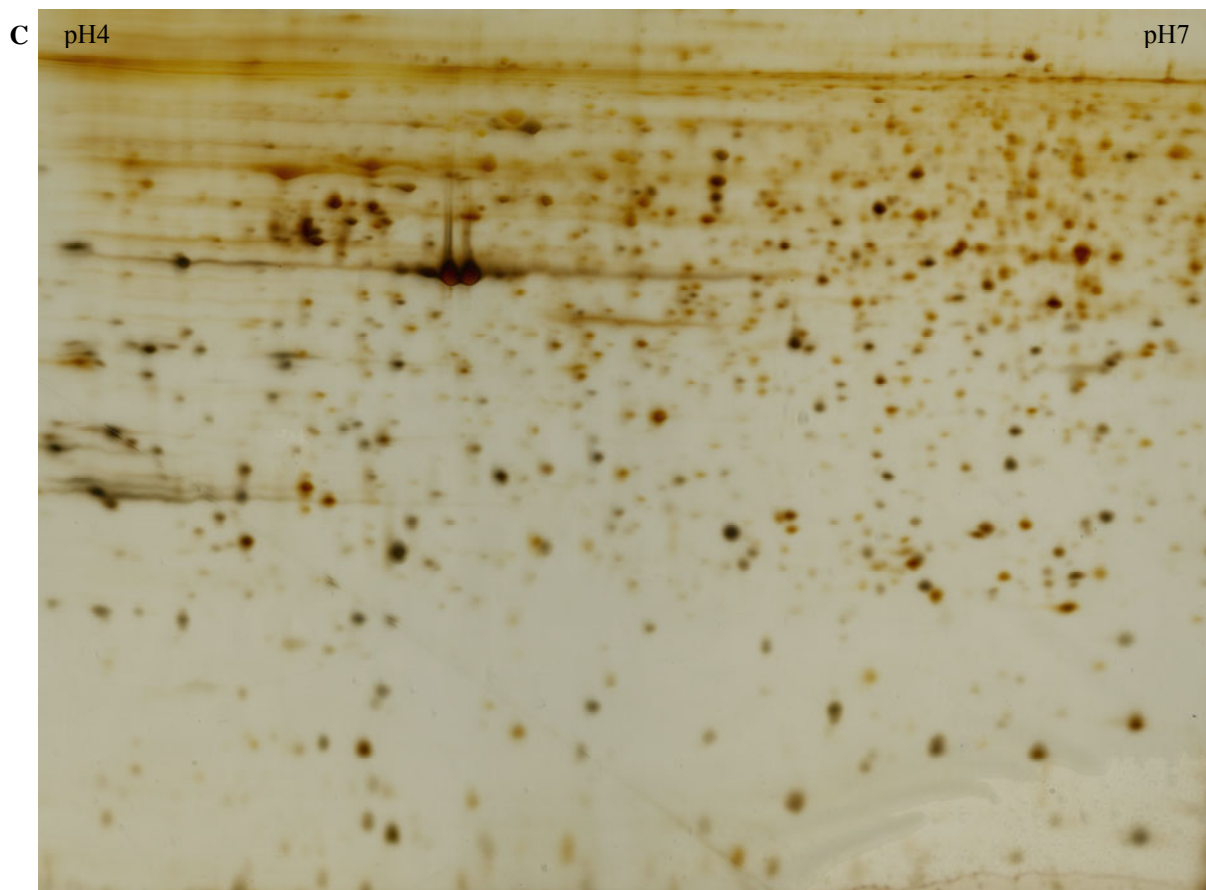
C. Zustand nach Optimierung der isoelektrischen Fokussierung: sehr schwache Horizontalstreifen, keine Vertikalstreifen;



Bursa ET18, 100  $\mu$ g



Bursa ET18, 50  $\mu$ g



Bursa ET18, 50  $\mu$ g



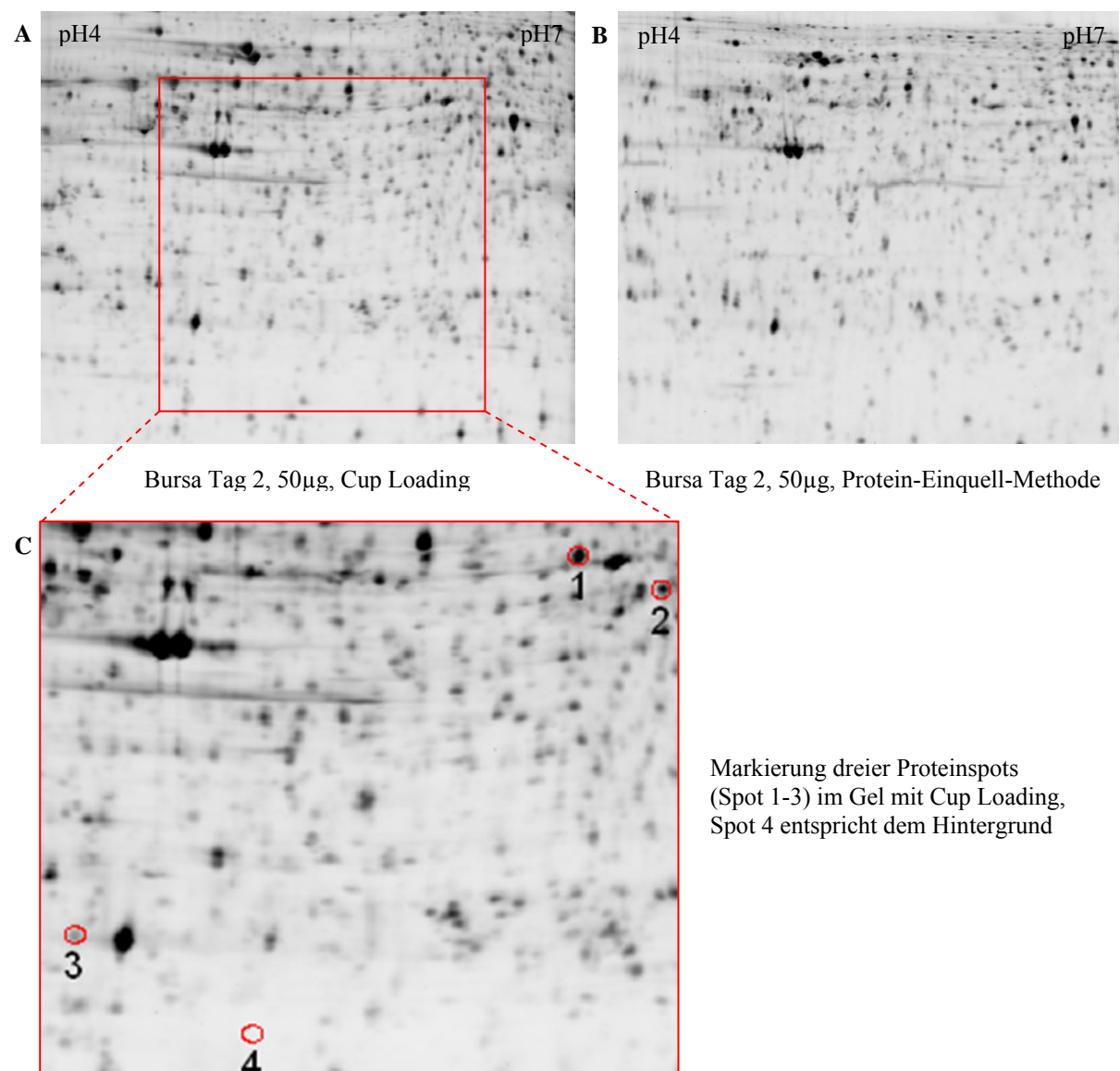
Als weitere Möglichkeit, die Vertikalstreifen durch die Proben-Cups im Gel vollständig zu umgehen, erwies sich das Einquellen der Proteinproben direkt bei Rehydratisierung des Fokussierungsstreifens, wie unter 4.6.1 beschrieben. Allerdings ist bei dieser Methode mit höheren Protein-Verlusten zu rechnen [90], weshalb sie in dieser Arbeit schlußendlich nur für die Erstellung der präparativen Gele zum Einsatz kam. Eine relative Quantifizierung dieser Proteinverluste zeigen Abb. 20 und Tab. 11 aufgrund eines Vergleichs repräsentativer Spotintensitäten zur Hintergrundintensität („Signal-to-noise-ratios“). Hierbei wurden jeweils drei Spots auf einem per „Cup-Loading“ und einem per Protein-Einquell-Methode erstellten Gel hinsichtlich ihrer Intensitäten verglichen. Anschließend wurde die „Signal-to-noise-ratio“ der Spots bestimmt, indem die Intensität der Spots durch diejenige einer exakt gleich großen Fläche des Gels ohne erkennbaren Spot („Hintergrund“) dividiert wurde.

**Abb. 20 IEF – Vorversuch zu Cup-Loading versus Protein-Einquell-Methode**

Zwei 2D-DIGE-Gele mit Bursalysat Tag 2, Fluoreszenzfärbung mit Cy3

A: Fokussierung mittels Cup Loading; B: Fokussierung mittels der Protein-Einquell-Methode

C: Vergrößerter Ausschnitt des Cup-Loading-Gels





**Tab. 11 IEF – Vorversuch zu Cup-Loading versus Protein-Einquell-Methode**

Auswertung der beiden Gele aus Abb. 20 in der „Image Quant“-Software, es wurden jeweils 3 Spots hinsichtlich ihrer Intensität (Pixelvolumen) verglichen. Anschließend wurde die „Signal-to-noise-ratio“ der Spots durch Division der Spotvolumen durch das Hintergrundvolumen bestimmt.

Spot	Art	Volumen Cup Loading	Volumen Protein-Einquellen	Signal-to-noise-ratio Cup Loading	Signal-to-noise-ratio Protein-Einquellen
1	stark	1964173,34	1648848,29	50,04	31,46
2	mittel	920353,65	1074450,91	23,45	20,50
3	schwach	339307,94	308788,63	8,64	5,89
4	Hintergrund	39253,77	52408,88		

Die Signal-zu-Rausch-Verhältnisse der Spots lassen Rückschlüsse auf die Gesamt-Proteinmenge im jeweiligen Gel zu, wobei höhere Werte für höhere Protein-Mengen im Gel sprechen. In diesem Fall hatten alle untersuchten Spots im Gel mit der „Cup-Loading“-Methode höhere „Signal-to-noise“-Werte. Dies deutet darauf hin, dass bei dieser Methode im Vergleich zur Protein-Einquell-Technik eine höhere Menge an Protein ins Gel übergeht.

### 5.3.2. Optimierung der 2D-Gelelektrophorese

Auch die zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese bedurfte zu Beginn der Experimente einiger Optimierungen, welche im Rahmen einer Reihe von Vorversuchen erfolgte. Zunächst war das Ziel, eine möglichst gleichmäßige Polymerisation der Polyacrylamid-Gellösung zu erreichen, da Unregelmäßigkeiten in der gitterartigen Polymerstruktur direkte Auswirkungen auf das Laufverhalten der Proteine im Gel und damit auf das spätere Gelbild haben. So waren an Stellen mit unregelmäßiger Polymerisation deutliche Verzerrungen im Spotmuster zu erkennen (siehe Abb. 21 A). Da hierfür oft eine zu starke Hitzeentwicklung beim Gießvorgang verantwortlich ist, welche durch die exotherme Reaktion der Polymerisation der Acrylamid-Bestandteile zur Polyacrylamid-Matrix verursacht wird, wurden verschiedene Vorkehrungen getroffen, um dieses Phänomen abzumildern. So wurde die Gellösung vor dem Gießen der Gele auf 5-7° C vorgekühlt, sowie die einzelnen Gelkassetten voneinander durch den Einsatz von Plastik-Trennscheiben und Plastik-Gelkassetten-Dummies isoliert. Außerdem wurde die Geschwindigkeit des Gelzuflusses, von dessen Geschwindigkeit wiederum die Schnelligkeit der Polymerisationsreaktion abhängt, mittels einer eigens konstruierten Einfüll-Vorrichtung (siehe 4.5.2) reguliert.

Ein weiteres Problem, welches in den Gelbildern in Erscheinung trat, waren unregelmäßige Gel-Oberkanten, wie Sie durch Luftblasen beim Gießen oder durch Wellenbildung bei der Überschichtung der Gele entstanden. Diese unregelmäßigen Gel-Oberkanten verhinderten im weiteren Verlauf das plane Aufliegen des isoelektrischen Fokussierungstreifens auf dem 2D-

Gel, was jedoch für einen ungestörten Übergang der Proteine aus dem Streifen in das Gel unerlässlich ist. Dadurch entstanden an einzelnen Stellen charakteristische Wellen im Spotmuster der 2D-Gele (siehe Abb. 21 B). Zur Behebung dieses Problems wurden verschiedene Überschichtungstechniken getestet, wobei sich die Verwendung von Aqua bidest. aus einer handelsüblichen 5 ml-Spritze mit aufgesetzter Kanüle als am geeignetsten herausstellte.

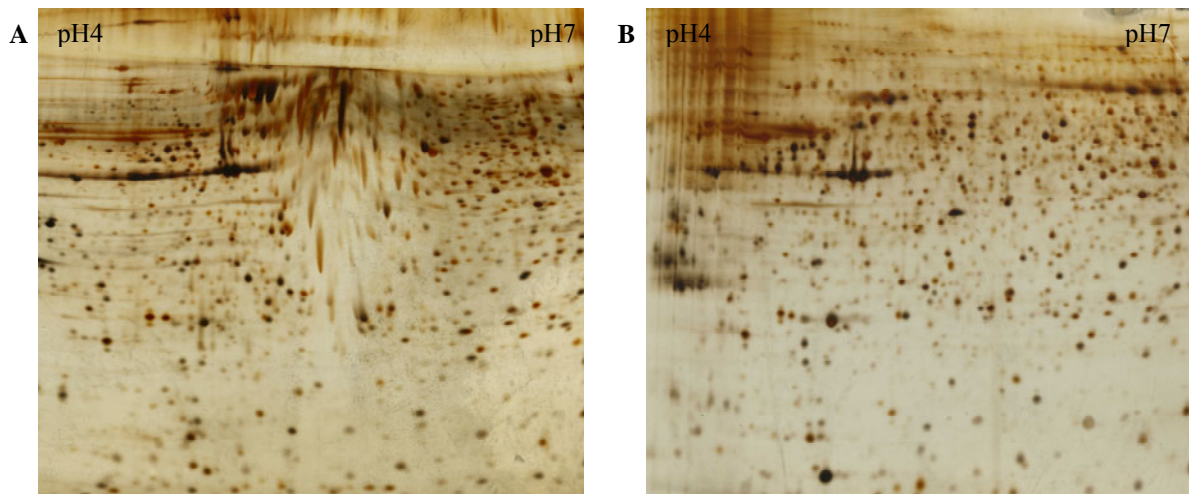
**Abb. 21 2D-Gele - Vorversuche zu Polymerisation und Überschichtungstechnik**

Dargestellt sind 3 silbergefärbte 2D-Gele mit Bursalysaten verschiedener Stadien.

A: Verzerrungen im Spotmuster im mittleren oberen Bereich des Gelbildes

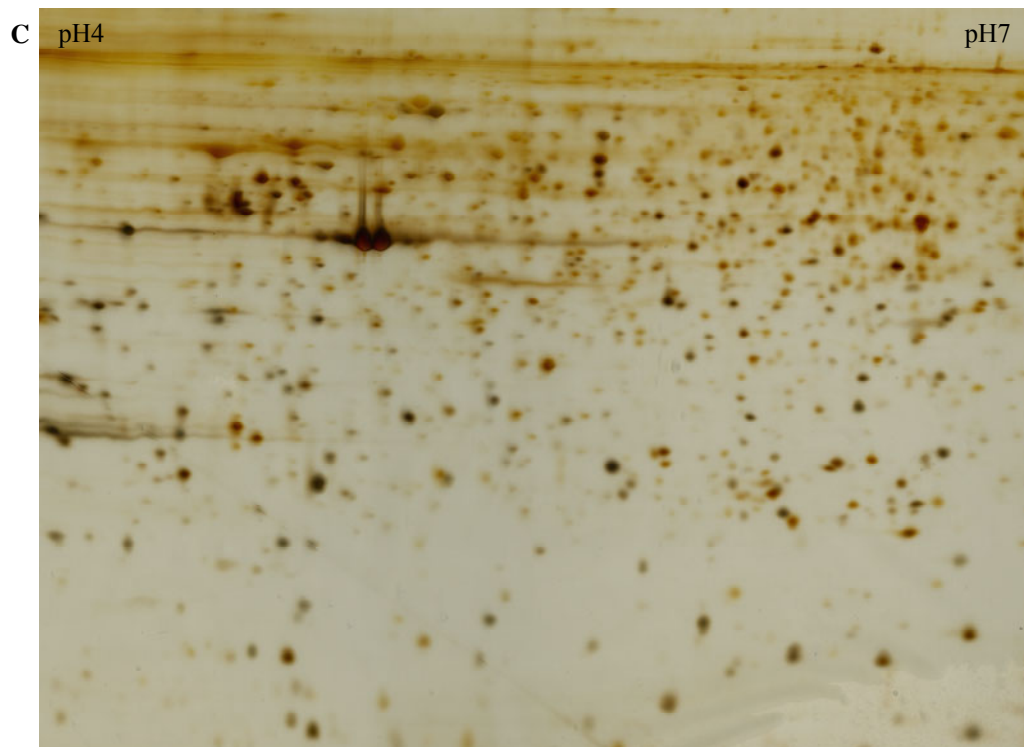
B: Wellenartigen Verzerrungen im Spotmuster am oberen linken Rand

C: Gleichmäßig polymerisiertes 2D-Gel nach Optimierung des Gießvorgangs



Bursa Tag 2, 50 µg

Bursa ET10, 100 µg



Bursa ET18, 50 µg

Eine Übersicht über die Ergebnisse aller Vorversuche geben Tab. 12 und Tab. 13.

**Tab. 12 Optimierte Bedingungen für die isoelektrische Fokussierung**

Problem	Lösung
Horizontalstreifen	Reduzierung der Probenmenge auf 50 µg
	Einfügen eines initialen Fokussierungsschrittes von 150 V über 4 h
Vertikalstreifen	Auffüllen des Probenvolumens auf 100 µl
	Protein-Einquell-Methode für präparative Gele

**Tab. 13 Optimierte Bedingungen für die 2D-Gelelektrophorese**

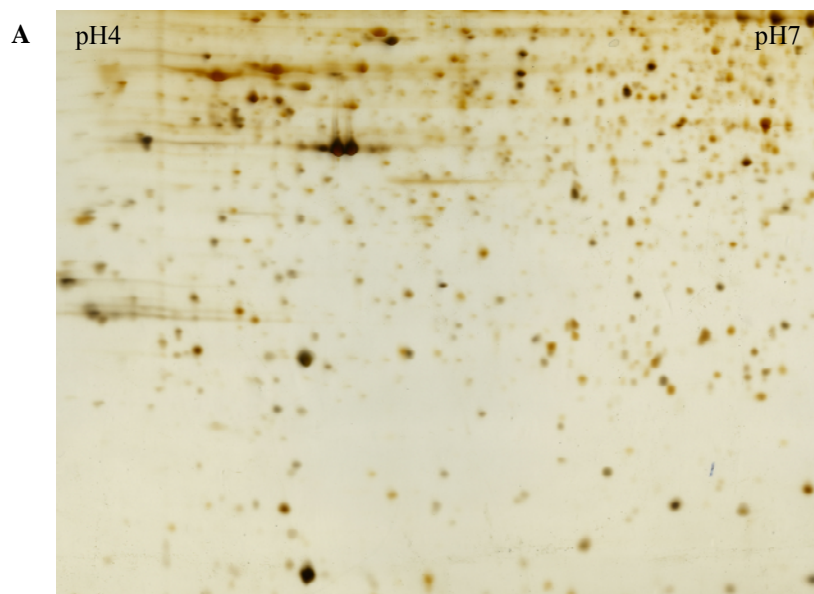
Problem	Lösung
Verzerrungen im Spotmuster	Vorkühlen der Gellösung auf 5-7° C
	Isolierung der Gelkassetten durch Plastik-Dummies
	Regulierung des Gelzuflusses
Wellenbildung in Geloberkante	Überschichtung der Gele mit Aqua bidest. aus 5 ml-Spritze

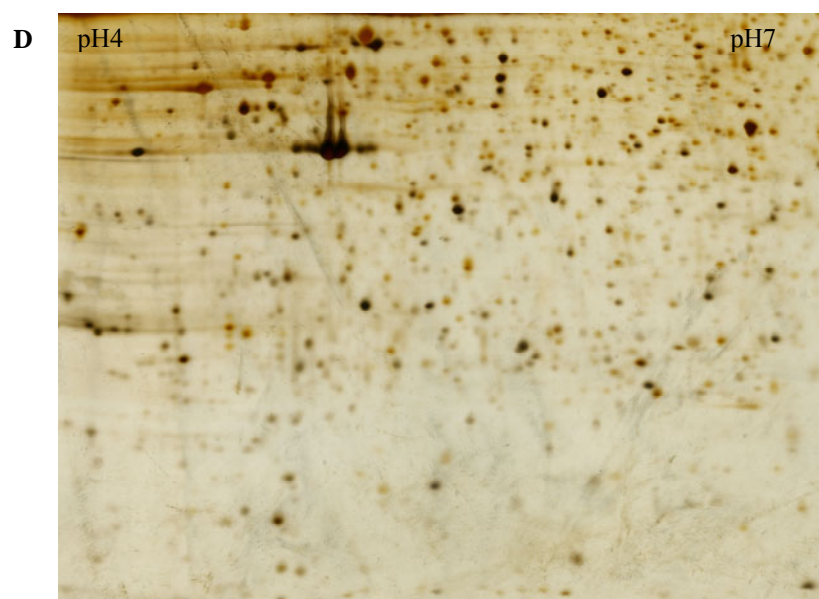
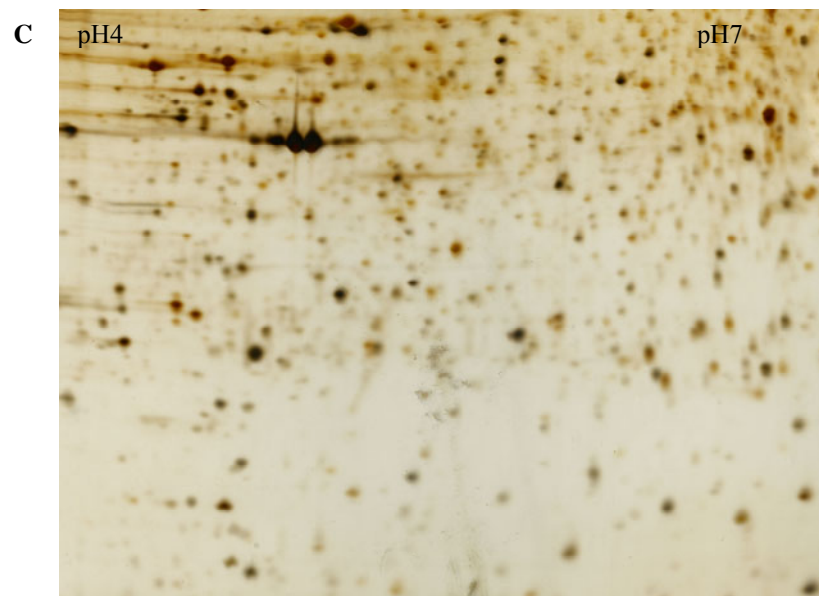
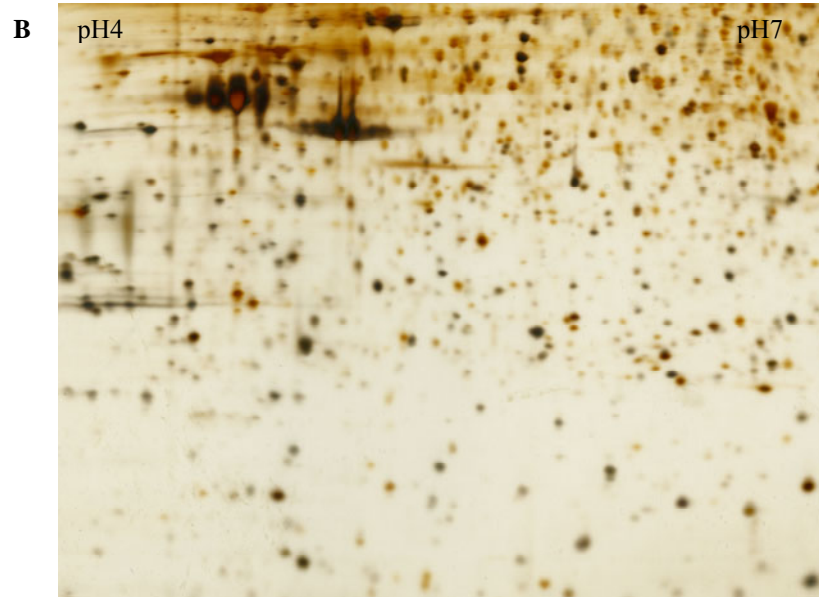
### 5.3.3. Qualitätskontrolle der Bursapropen durch 2D-Silbergele

Um die Qualität der entnommenen Bursapropen zu überprüfen wurde pro Zeitpunkt und Replikat je ein Silbergel mit 50 µg Protein angefertigt (siehe Abb. 22). Dies ergab bei acht biologischen Replikaten (incl. der zwei Reserve-Replikate) an 4 Entwicklungszeitpunkten 32 Silbergele. Alle Gele zeigten gleichmäßige Spotmuster ohne besondere Auffälligkeiten. Zur Durchführung der folgenden Analysen wurden zu jedem Zeitpunkt sechs biologische Replikate ausgewählt, wobei Proben mit vergleichsweise hohen Gesamt-Proteinmengen bevorzugt verwendet wurden.

**Abb. 22 2D-Silbergele**

Gezeigt ist je ein repräsentatives biologisches Replikat der Lysate von ET10 (A), ET18 (B), Tag 2 (C) und Tag 28 (D) in der Silberfärbung mit einem Probenauftrag von jeweils 50 µg.



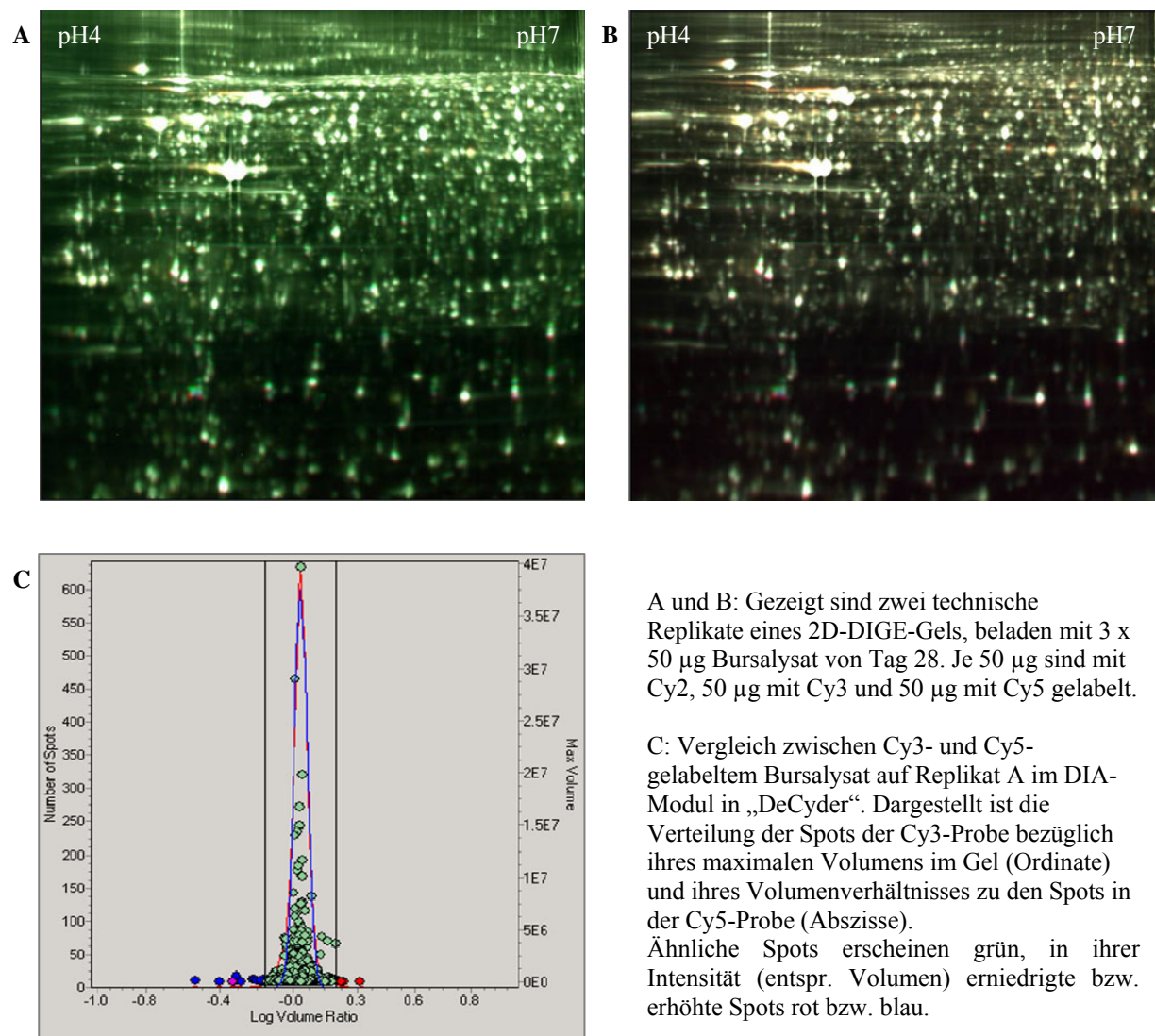




### 5.3.4. Fluoreszenzfarbstofftest / Same-Same-Experiment

Im Sinne eines Vortests der verwendeten Charge der Minimal-Labeling-Farbstoffe wurde ein so genanntes „Same-Same“-Experiment durchgeführt, wobei je 50 µg derselben Probe mit Cy2, Cy3 und Cy5 kovalent markiert und anschließend auf einem Gel aufgetrennt wurden. Dies erfolgte in zwei technischen Replikaten, also zwei exakt gleich beladenen Gelen (siehe Abb. 23 A und B). Makroskopisch erscheinen fast ausschließlich weiße Spots auf den Gelbildern, welche durch eine Überlagerung der drei Fluoreszenzfarbstoffe an derselben Stelle im Gel entstehen.

Abb. 23 Same-Same-Experiment



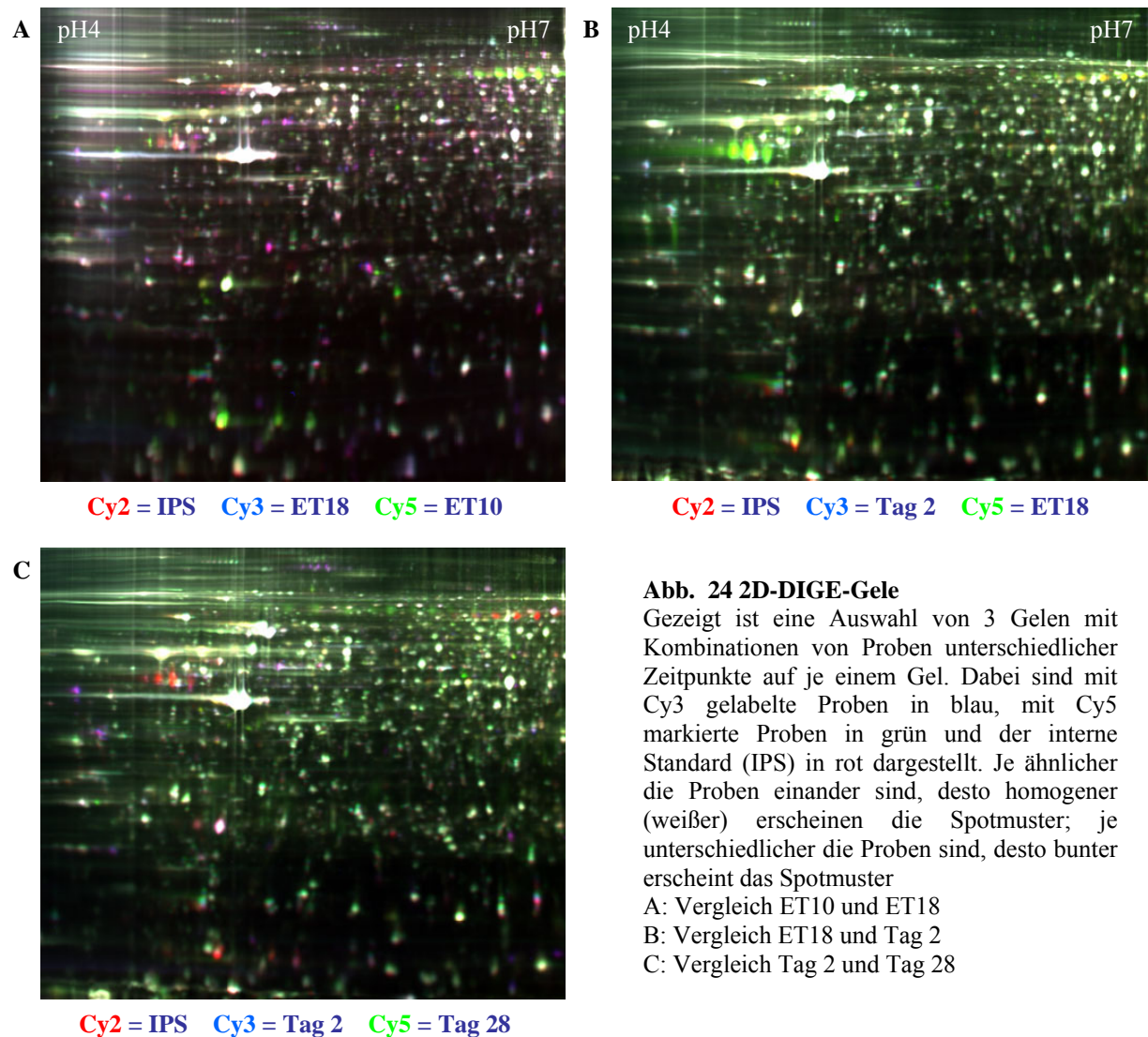
Anschließend erfolgte die Auswertung der Gelbilder im DIA-Modul der „DeCyder“-Software. Dabei ergab sich für das erste technische Replikat unter Einhaltung der Filterkriterien wie unter 4.5.6 beschrieben eine Anzahl von 2596 detektierten Proteinspots, von denen im Vergleich der mit Cy3 und Cy5 gelabelten Proben 2577 (oder 99,3 %) als

ähnlich intensiv eingestuft wurden. 15 Spots (oder 0,6 %) waren in ihrer Intensität gegenüber der zweiten Probe erniedrigt und vier Spots (oder 0,2 %) in ihrer Intensität erhöht. Hierbei wurden die Grenzen für Spots ähnlicher Intensität auf eine Änderung von maximal  $\pm 1,5$ -fach gesetzt. Beim zweiten Replikat ergaben sich ähnliche Werte für den Vergleich zwischen Cy3 und Cy5; es wurden 2446 Spots detektiert, davon waren 2423 (oder 99,1 %) ähnlich, 12 (oder 0,5 %) erniedrigt und 11 (oder 0,4 %) erhöht.

Die hohe Zahl an Spots ähnlicher Intensität zwischen unterschiedlich gelabelten Proben spricht für eine sehr reproduzierbare Verarbeitung der Proben im Hinblick auf die Fluoreszenzmarkierung. Damit ist kein Unterschied zwischen den einzelnen Farbstoffen bezüglich des Erfolgs der Labeling-Reaktion erkennbar. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Fluoreszenz-Farbstoff-Charge des Vorexperiments auch für das 2D-DIGE-Experiment verwendet.

### **5.3.5. Anfertigung der analytischen 2D-Gele**

Nach dem zuvor erstellten, detaillierten Plan für das DIGE-Experiment (siehe 4.5.4 und Tab. 7) wurden 36 2D-DIGE-Gele angefertigt und im „Typhoon 9400“ gescannt. Die erfolgreiche Durchführung des Experiments hatte reproduzierbare, gut aufgetrennte Spotmuster auf allen 108 entstandenen Fluoreszenzbildern der 36 Gele zur Folge. Da die Gelbilder zu zwei Dritteln aus technischen Replikaten der selben Probe bestanden, wurden aus ihnen jene ausgewählt, bei denen das Bursalysat sowohl in der ersten als auch in der zweiten Dimension am besten aufgetrennt wurde. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Farbstoffwechsel oder „Dye Swap“ zwischen Cy3 und Cy5 für die einzelnen Entwicklungszeitpunkte nach der Hälfte der Replikate eingehalten wurde (siehe 4.5.4). Die Ergebnisse der Auswahl sind der Abb. CD1 auf der beigefügten CD-ROM zu entnehmen. Abb. 24 zeigt drei repräsentative Gele, auf denen jeweils ein Vergleich zwischen ET10 und ET18, zwischen ET18 und Tag 2 und zwischen Tag 2 und Tag 28 zu sehen ist. Hierbei lassen sich bereits makroskopisch sichtbare Veränderungen zwischen den einzelnen Entwicklungszeitpunkten erkennen. Durch die unterschiedliche Färbung einzelner Spots wird bereits optisch erkennbar, dass zwischen ET10 und ET18 die deutlichsten Unterschiede auftreten, während die folgenden Zeitpunkte in der Farbverteilung zwar homogener erscheinen, jedoch dennoch einzelne Unterschiede erkennen lassen.



**Abb. 24 2D-DIGE-Gele**

Gezeigt ist eine Auswahl von 3 Gelen mit Kombinationen von Proben unterschiedlicher Zeitpunkte auf je einem Gel. Dabei sind mit Cy3 gelabelte Proben in blau, mit Cy5 markierte Proben in grün und der interne Standard (IPS) in rot dargestellt. Je ähnlicher die Proben einander sind, desto homogener (weißer) erscheinen die Spotmuster; je unterschiedlicher die Proben sind, desto bunter erscheint das Spotmuster

A: Vergleich ET10 und ET18

B: Vergleich ET18 und Tag 2

C: Vergleich Tag 2 und Tag 28

### 5.3.6. Auswertung der 2D-Gele mittels „DeCyder 7.0“

Die zuvor ausgewählten Gelbilder wurden mittels des „Image Loader“-Moduls in „DeCyder“ geladen und zunächst im DIA-Modul (engl.: Differential In-Gel Analysis) einer vergleichenden Gelbildanalyse unterzogen, wobei unter Einhaltung der Filterkriterien wie unter 4.6.6 beschrieben pro Gel zwischen 2150 und 2577 Protein-Spots detektiert wurden. Die weitere Auswertung erfolgte im BVA-Modul (engl.: Biological Variation Analysis) in welchem eine biologische Varianzanalyse aller Proben durchgeführt wurde, unabhängig davon auf welchem Gel sie aufgetrennt wurden (siehe auch 4.6.6). Dabei wurde das Gel mit den meisten detektierten Spots als Master-Gel für das so genannte „Matchen“, also die Zuordnung der Protein-Spots zwischen den einzelnen Gelen herangezogen. Für jedes Gel konnten mindestens 1620 Spots den zugehörigen Spots im Mastergel zugeordnet werden.

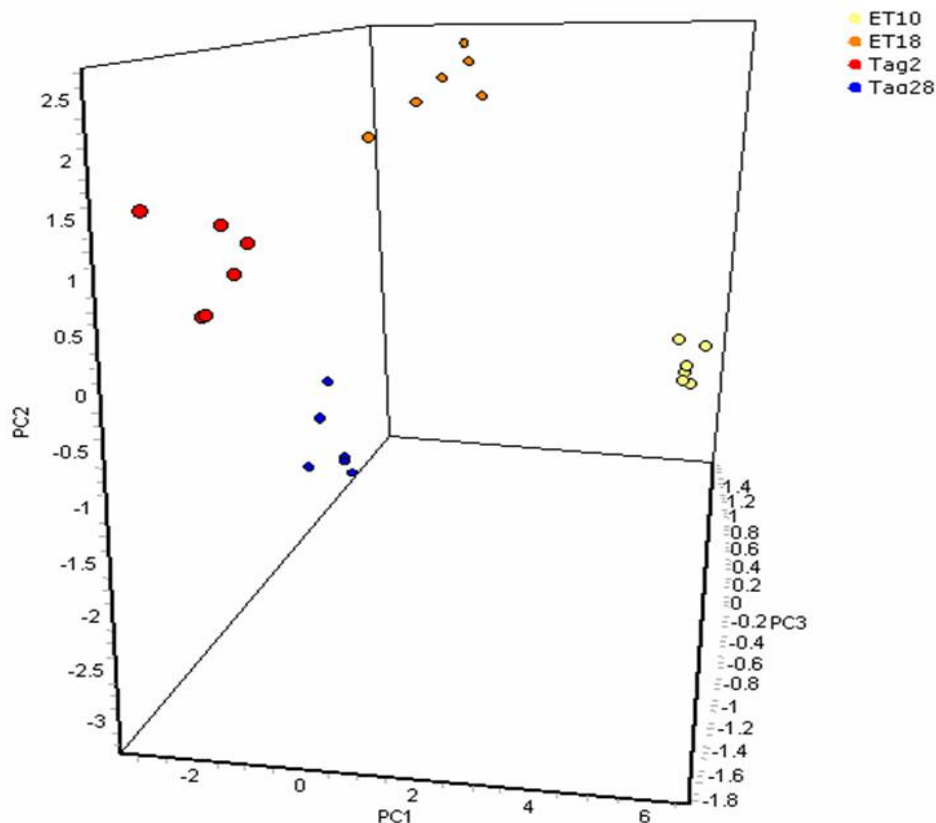
Die im BVA-Modul generierten, differentiellen Daten wurden im EDA-Modul einer erweiterten Datenanalyse (engl.: Extended Data Analysis) im Sinne einer statistischen

Auswertung unterzogen. Zunächst wurde eine „Principal Component Analysis“ (PCA), durchgeführt (siehe Abb. 25).

**Abb. 25 Principal Component Analysis**

Dargestellt ist die 3D-Ansicht einer Principal Component Analyse in „DeCyder“. Auf den drei Raumachsen sind jeweils unterschiedliche „Principal Components“ gegeneinander aufgetragen, d.h. die Kriterien, nach denen die Bilddaten der einzelnen Gelbilder („Spot Maps“) komprimiert wurden. Jede „Spot Map“ ist durch einen Punkt dargestellt. Räumliche Nähe zwischen den Punkten reflektiert ähnliche zu Grunde liegende Expressionsmuster.

Spot Maps (Score Plot)



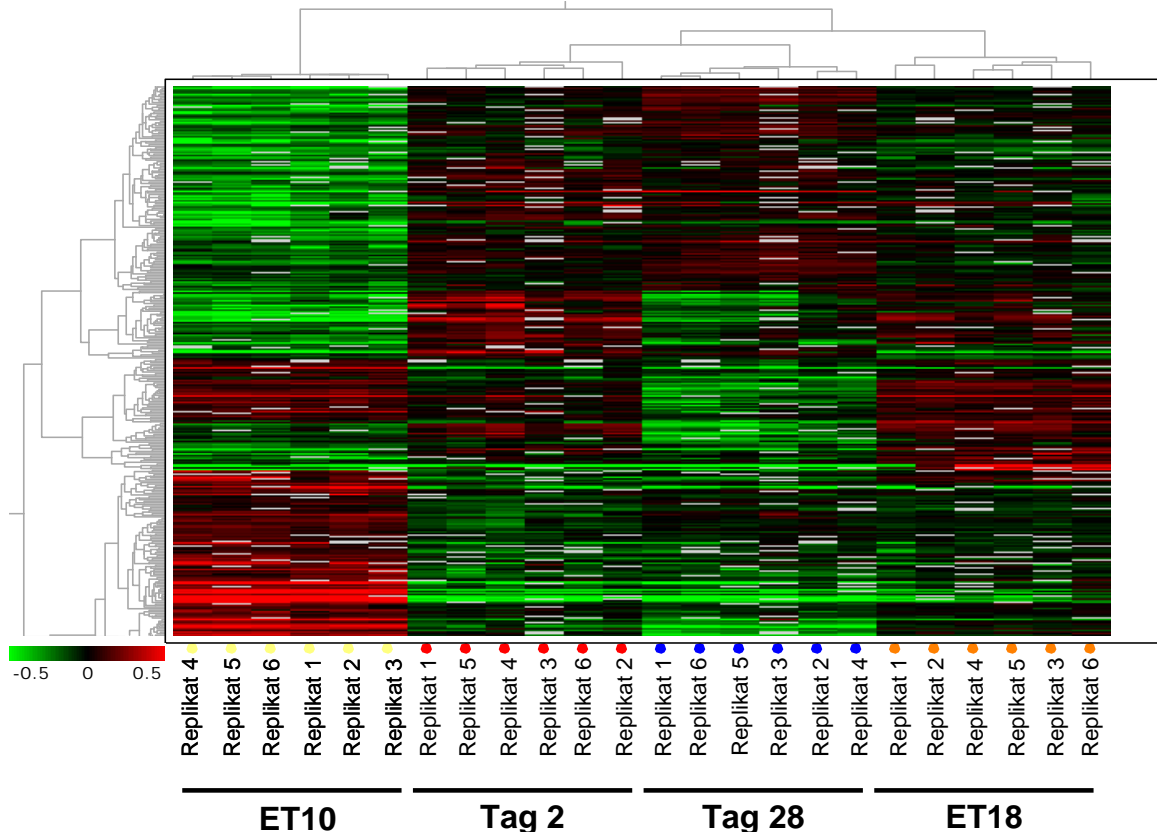
Die PCA bietet die Möglichkeit zur Kompression multivariabler Daten durch mathematisches „Clustering“, d.h. durch Zusammenfassen ähnlicher Muster zu einer Einheit. Alle Gelbilder des Experimentes wurden ohne vorherige Zuordnung zu einer Gruppe mit dem PCA-Modul der „DeCyder“-Software analysiert. Dabei bildeten sich deutlich abgrenzbare Gruppen, in denen jeweils alle sechs biologischen Replikate eines Entwicklungszeitpunktes vertreten sind. Dies bedeutet, dass deutliche Unterschiede im Proteom der einzelnen Zeitpunkte gefunden wurden. Die biologischen Replikate innerhalb eines Zeitpunktes bildeten aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit gemeinsame „Cluster“. Dies zeigt, dass reproduzierbare, charakteristische Unterschiede im quantitativen Proteinexpressionsprofil der vier Stadien existieren. Es läßt sich gut erkennen, daß ET10 relativ isoliert steht und damit die umfangreichsten Proteomveränderungen aufweist, während die anderen Zeipunkte zwar abgrenzbare Gruppen bilden, jedoch insgesamt näher zusammen liegen.



Weiterhin wurden die differentiellen Daten in einer so genannten „Heatmap“ dargestellt, welche die unterschiedlichen „Spot Maps“, also die Gelbilder, incl. der darin aufgegliederten Einzel-Spots in Gruppen einteilen (siehe Abb. 26).

#### Abb. 26 Heatmap

Darstellung der 2D-DIGE Daten in einer Heatmap. Die Spalten repräsentieren die einzelnen biologischen Replikate, welche jeweils mit einem farbigen Punkt markiert sind (gelb für ET10, orange für ET18, rot für Tag 2 und blau für Tag 28). Die grauen Linien verbinden ähnliche Replikate zu Gruppen. Die Zeilen repräsentieren die differentiellen Proteinspots. Durch die Farben sind die logarithmierten Abundanzen der einzelnen Proteinspots im Vergleich zum Standard dargestellt, erhöhte Abundanzen in rot und erniedrigte in grün.



Dabei wurden die Abundanzen der einzelnen Protein-Spots im Vergleich zum internen Standard farbig dargestellt, erhöhte Abundanzen rot und erniedrigte grün. Hier wurde einerseits sichtbar, daß die Abundanzen für ein bestimmtes Protein innerhalb eines Entwicklungszeitraumes sehr homogen sind und andererseits, beim Vergleich der verschiedenen Stadien, daß Tag 2 und Tag 28 sehr nahe beieinander liegen, während ET18 etwas weiter entfernt ist. Dennoch bildet ET18 mit Tag 2 und Tag 28 eine Gruppe, während ET10 von allen anderen Stadien am weitesten entfernt ist, was auch schon in der PCA deutlich wurde.

Als nächster statistischer Analyseschritt wurden im EDA-Modul Gruppenvergleiche der Stadien mittels Student's T-test angefertigt. Dabei wurde ET10 mit ET18 verglichen, ET18 mit Tag 2 und schließlich Tag 2 mit Tag 28. Die Grenzen für den p-Wert wurden auf 0,01 und für die „Average Ratio“, welche die standardisierten Abundanzen eines Stadiums mit denen

eines weiteren Stadiums in Beziehung setzt, auf  $\pm 1,5$  festgesetzt. Des Weiteren wurden nur Proteinspots berücksichtigt, welche auf allen 36 Gelen detektiert werden konnten. Bei Anwendung dieser stringenten Kriterien ergaben sich für den Vergleich von ET10 und ET18 155 differentiell abundante Proteine, beim Vergleich von ET18 und Tag 2 11 Proteine und zwischen Tag 2 und Tag 28 33 signifikant veränderte Proteine (siehe Tab. 14). Es wird auch hier deutlich, dass die meisten Änderungen auf Proteomebene zu den frühen Entwicklungszeitpunkten stattfinden, gefolgt von den Veränderungen in der relativ langen Zeitspanne zwischen Tag 2 und Tag 28 nach dem Schlupf und an letzter Stelle den Unterschieden zwischen ET18 und Tag 2, den Zeitpunkten kurz vor und kurz nach dem Schlupf.

**Tab. 14 Differentiell abundante Proteine**

	Group-to-group-comparison						Multiple comparison	
	Student's T-test p < 0.01, incl. FDR-correction						One-way-ANOVA p < 0.01, incl. FDR-correction	
	ET10 und ET 18		ET18 und Tag 2		Tag 2 und Tag 28			
Average Ratio	Spots	auf 36 Gelbildern	Spots	auf 36 Gelbildern	Spots	auf 36 Gelbildern	Spots	auf 36 Gelbildern
>1,5,<-1,5	276	155	16	11	55	33	893	402
>2, <-2	128	72	6	4	35	20		

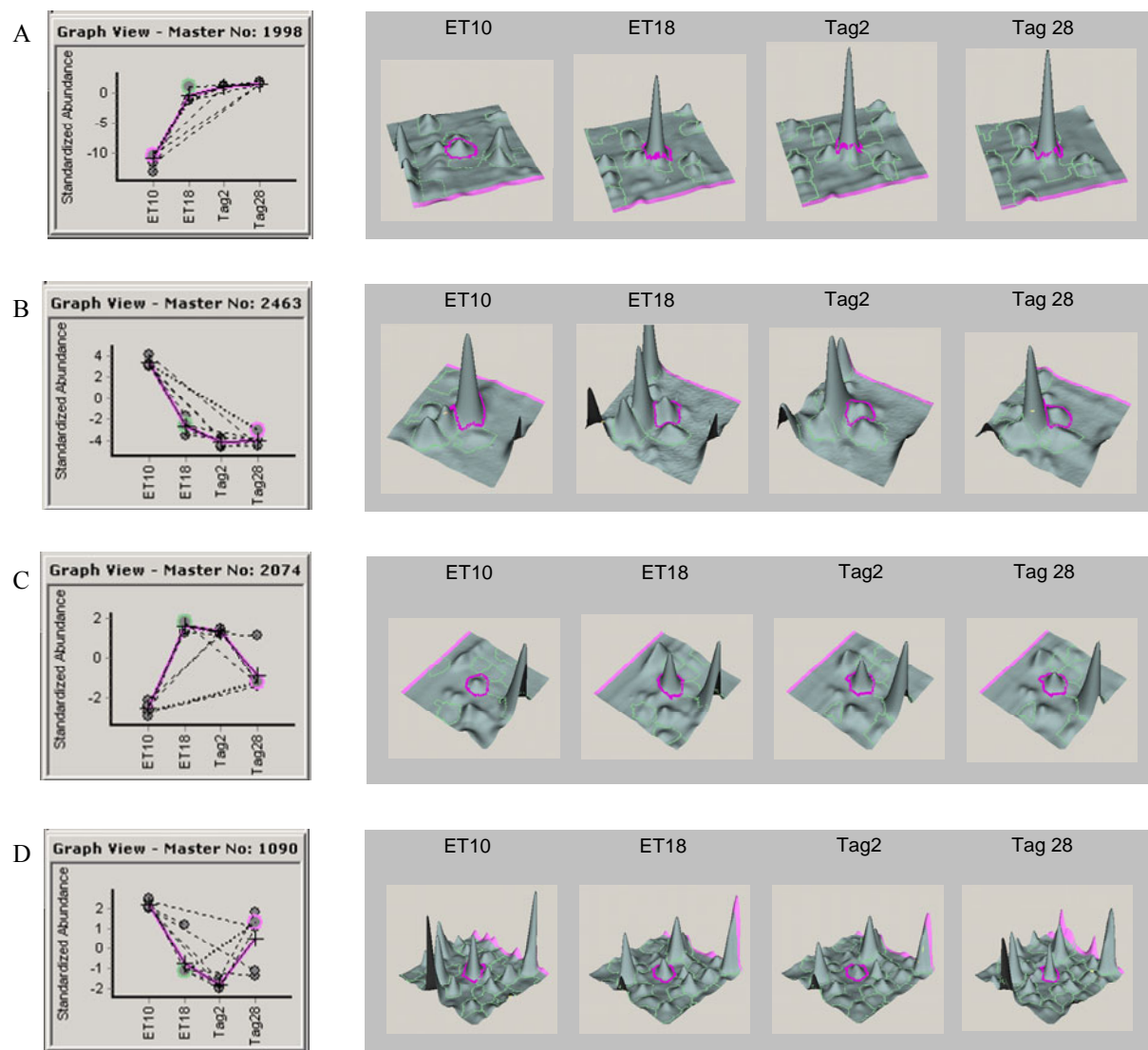
Bei einem anschließenden Vergleich der Proben über die vier verschiedenen Entwicklungszeitpunkte hinweg, der so genannten „Multiple Comparison“ mittels One-way-ANOVA, ergaben sich mehrere Hundert differentiell abundante Proteine zwischen den vier Stadien ( $p < 0,01$ ), von denen 402 Spots auf allen 36 Gelbildern detektiert werden konnten (siehe Tab. 14). Aus diesen wurden 242 prominente, manuell bestätigte Spots für die anschließende Proteinidentifikation ausgewählt.

Bei Betrachtung der einzelnen differentiell abundanten Proteinspots im Vergleich zwischen den vier Entwicklungsstadien konnten unterschiedliche wiederkehrende Expressionsmuster detektiert werden (siehe Abb. 27). Darunter waren sowohl über den gesamten Entwicklungsverlauf ansteigende als auch im Gesamtverlauf kontinuierlich abfallende Verlaufskurven. Des Weiteren zeigten sich auch Profile, die zu den beiden mittleren Zeitpunkten erhöhte oder verminderte Abundanz zeigten und sich dann wieder in Richtung ihres Ausgangswertes bewegten. Die Expressionsprofile aller identifizierten Proteine können Tab. CD10 entnommen werden. Abb. 27 A zeigt das Expressionsprofil eines Proteinspots, welcher in seiner Abundanz über die vier Entwicklungszeitpunkte fortlaufend ansteigt sowie die zugehörige 3D-Ansicht zu den einzelnen Entwicklungszeitpunkten in „DeCyder“. Eine

ähnliche Verlaufsform zeigen auch 48 weitere Proteinspots im 2D-DIGE-Experiment. Hierbei handelt es sich entweder um Proteine, welche vermehrt zu den späteren Entwicklungszeitpunkten in der Bursa Fabricii exprimiert sind oder aber solche, die durch eine vermehrte Anzahl an B-Zellen in den späteren Bursastadien bedingt sind.

**Abb. 27 Expressionsprofile differentiell abundanter Protein-Spots**

A bis D: Dargestellt sind wiederkehrende Protein-Expressionsprofile im „Multiple Comparison“-Modus in „DeCyder“. Im Graphen auf der linken Seite ist auf der Ordinate jeweils die „standardized abundance“, die Abundanz des Proteins in Bezug auf den Standard, und auf der Abszisse die vier Entwicklungszeitpunkte aufgetragen. Für jedes Stadium sind sechs Werte für die sechs biologischen Replikate mit einem Punkt markiert. Gestrichelte Linien verbinden auf demselben Gel aufgetrennte Proben. Rechts daneben ist die Veränderung der Abundanz über die vier Entwicklungsstadien in der „DeCyder-Graph View“ zu sehen.



Ein diesem Verlauf entgegengesetztes Bild ist in Abb. 27 B dargestellt, das Expressionsprofil eines Proteinspots, welcher über die Zeit in seiner Abundanz abnimmt. Ähnliche Verlaufsformen wurden bei 72 weiteren Proteinen gefunden und können entweder durch speziell in der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielende Proteine bedingt sein, welche im Verlauf der weiteren Entwicklung deutlich weniger exprimiert werden, oder aber

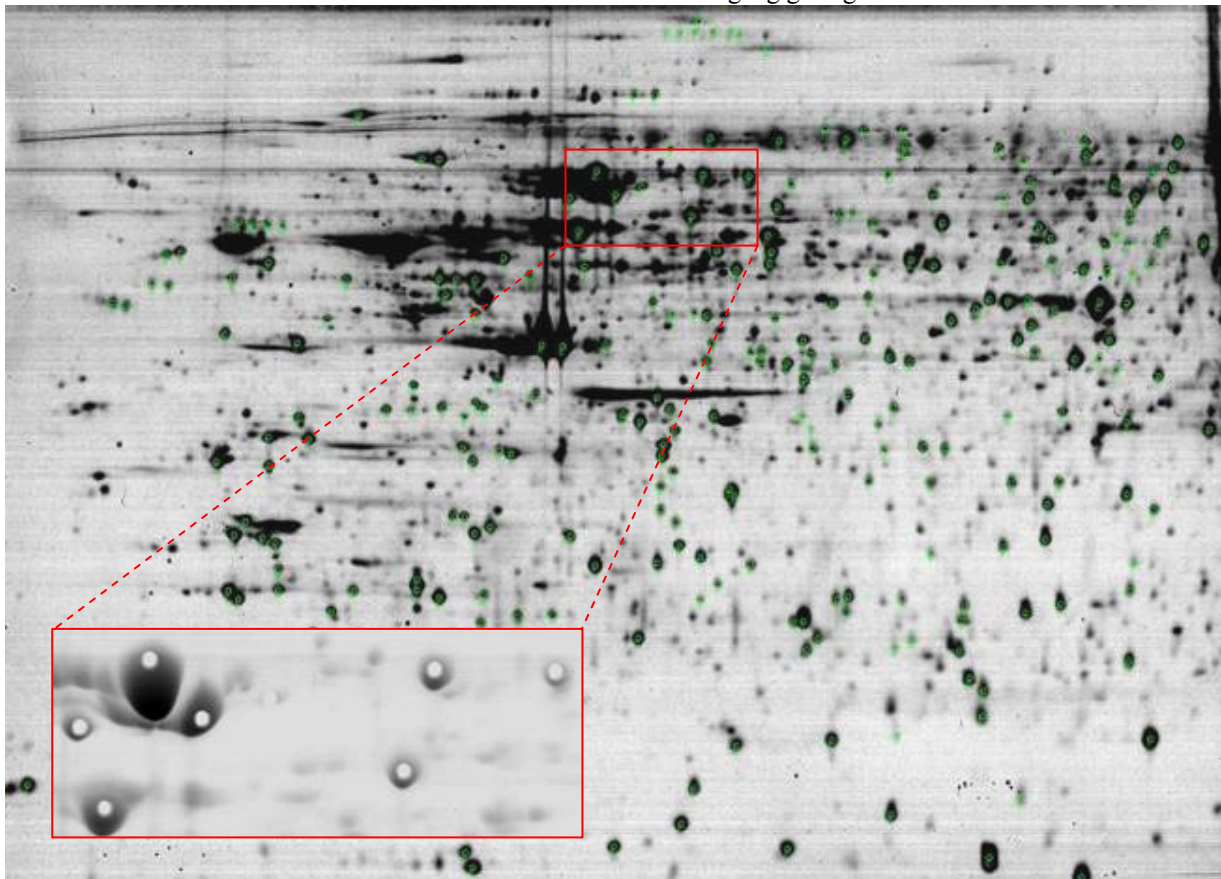
es handelt sich dabei um aus dem Stroma stammende Proteine, die durch vermehrte Einwanderung und Proliferation der B-Zellen in das Bursagewebe in den Proben der späteren Zeitpunkte weniger in Erscheinung treten. Abb. 27 C und D zeigen Verlaufsmuster, welche in ihrer Abundanz im Verlauf zunächst ansteigen (36 Proteine) oder abfallen (13 Proteine) und sich gegen Ende der Bursaentwicklung wieder ihrem Ausgangswert nähern. Diese Profile sind besonders interessant, da sie sich nicht allein durch eine zu den späteren Zeitpunkten vermehrte Einwanderung von B-Zellen in die Bursa Fabricii erklären lassen, sondern durch eine um den Zeitpunkt des Schlupfes deutlich vermehrte bzw. verminderte Expression des entsprechenden Proteins bedingt sein müssen.

### 5.3.7. Identifizierung der Proteine

Zur Identifizierung der differentiell abundanten Proteine wurde pro Entwicklungszeitpunkt je ein präparatives 2D-Gel mit 400 µg Protein angefertigt und Coomassie gefärbt (siehe Abb. 28). Ein weiteres präparatives Gel wurde aus 400 µg internem Standard (IPS) erstellt. Das Ausstanzen der Proteinspots erfolgte mit Hilfe des „Spot-Picking“-Roboters, der anschließende tryptische Verdau und die Vorbereitung der Proben für die MALDI-TOF/TOF-Analysen im „DigestProMS“-Roboter.

#### Abb. 28 Präparatives 2D-Gel

Dargestellt ist ein präparatives, Coomassie-gefärbtes 2D-Gel mit 400 µg Bursalysat von Tag 28. Die zum Picken vorselektierten Protein-Spots sind mit grünen Ringen markiert, im rot umrandeten Kasten in der unteren linken Bildhälfte ist ein Ausschnitt des Kontroll-Scans nach dem Pick-Vorgang gezeigt.



Um eine hohe Anzahl an Proteinspots zu identifizieren, wurden auf jedem der präparativen Gele möglichst viele der 242 zur Identifikation vorgesehenen Spots gepickt und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Abhängig von Färbung (Coomassie oder Fluoreszenz, vgl. 4.5.8) und Entwicklungszeitpunkt waren dies bis zu 222 Spots pro Gel. Dabei wurden die jeweils 96 intensivsten Spots per MALDI-TOF/TOF-Analyse, die übrigen per LC-MS/MS-Analyse weiter untersucht. Insgesamt konnten so 203 Spots identifiziert werden (MALDI-TOF/TOF:  $p < 0,05$ ; LC-MS/MS: Protein Score  $\geq 100$  und FDR  $< 1\%$ ). 184 dieser Spots konnten einem einzelnen Protein zugeordnet werden, in 19 Spots wurden Mischpopulationen bestehend aus zwei oder mehr Proteinen gefunden. Dies führte zu einer Identifizierung von insgesamt 253 Proteinen, welche in einer Übersicht in Tab. CD10 der CD-ROM aufgeführt sind. Besonders hervorzuheben sind darunter 214 Proteine, welche beim Huhn bisher noch nicht auf Proteinebene beschrieben wurden sowie 37 Proteine, welche gleich mehrfach aus verschiedenen 2D-Gel-Spots identifiziert wurden und damit vermutlich bisher unbekannte Molekulargewichts- oder Ladungs-Isoformen desselben Proteins darstellen (Tab. CD11). Eine Übersicht der in den Gruppenvergleichen mit einer „Average Ratio“ von mindestens  $\pm 2$  am stärksten abundanzveränderten, eindeutig identifizierten Proteine zeigen Tab. 15 bis Tab. 17, die Gesamtliste findet sich in Tab. CD12 auf CD.

**Tab. 15 Gruppenvergleich ET10 und ET18**

Spot-Nr.	Gen-Symbol	Protein Name	Average Ratio ET10 vs ET18 ( $p < 0,01$ )
9	TTR	Transthyretin	-9,7
175	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	-6,88
182	FABP7	Fatty acid-binding protein, brain	-3,84
1	APOA1	Apolipoprotein A-I	-3,38
84	FABP7	Fatty acid-binding protein, brain	-3,17
140	GC	Vitamin-D binding protein	-2,26
212	SEPT2	Septin 2	-2,14
78	PFN2	Profilin	-2,13
157	SERPINB1	Leukocyte elastase inhibitor (LEI)	2,03
193	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	2,07
200	TCP1	T-complex protein 1, alpha subunit	2,16
195	HNRNPH3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	2,24
89	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	2,28
188	PDXK	Pyridoxal kinase	2,31
37	DPYSL2	Collapsin response mediator protein-2A	2,32
227	PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	2,4
41	GSN	Gelsolin	2,55
71	ANXA8L1	Annexin A8-like protein 1	2,55
205	H4-I-VII	Histone 4	2,58
120	ALDH7A1	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	2,7
179	BPNT1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	2,75
127	ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C (Fragment)	2,93
185	DPYSL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	2,96
218	CALD1	Isoform Gizzard h-cad of Caldesmon	2,96

152	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	3,1
28	TPM2	Tropomyosin beta chain	3,54
105	SFN	14-3-3 sigma (Fragment)	4,11
145	ADA	Adenosine deaminase	4,49
56	DES	Desmin	5,43
46	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	7,01
191	BRD4	Bromodomain-containing protein 4	9,25
27	XAP121	Chloride intracellular channel protein 2	10,76

**Tab. 16 Gruppenvergleich ET18 und Tag 2**

Spot-Nr.	Gen-Symbol	Protein Name	Average Ratio ET18 vs Tag 2 (p < 0,01)
232	BDH1	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	-2,81
16	VIM	Vimentin	-2,69
227	PDHA1	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	-2,57

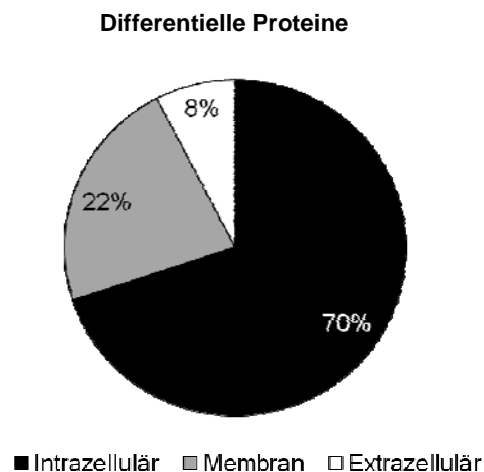
**Tab. 17 Gruppenvergleich Tag 2 und Tag 28**

Spot-Nr.	Gen-Symbol	Protein Name	Average Ratio Tag 2 vs Tag 28 (p < 0,01)
113	HSPB1	Heat shock protein beta-1	-5,69
89	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	-3,06
120	ALDH7A1	similar to Antiquitin	-3,03
1	APOA1	Apolipoprotein A-I	-2,99
84	FABP7	Fatty acid-binding protein, brain	-2,55
193	COL6A1	Collagen alpha-1(VI) chain	-2,53
157	SERPINB1	similar to Leukocyte elastase inhibitor (LEI)	-2,25

### 5.3.8. Gene Ontology

Ebenso wie die qualitativen Daten wurden auch die differentiellen Proteine der quantitativen Analyse einer genontologischen Auswertung unterzogen (siehe Abb. 29).

**Abb. 29 Gene Ontology: Zellulärer Bestandteil bei differentiellen Proteinen**  
 Prozentuale Anteile der differentiellen Proteine am jeweiligen Zellkompartiment.



Bei Betrachtung der Zugehörigkeit der Proteine zu den zellulären Bestandteilen ergaben sich ähnliche Anteile wie auch schon unter 5.2.4 für das qualitative Bursaproteom beschrieben. So bildeten auch hier intrazelluläre Proteine den größten Anteil, gefolgt von ca 20 % membranständigen und 8 % extrazellulären Proteinen. Wie auch für die qualitativen Daten wurden die Klassen „Zellteilung“, „Zellwachstum“, „Zelltod“, „Zelladhäsion“, „Zellmigration“ und „Immunsystem“ näher untersucht, deren zugehörige Proteine sich in den Tab. CD13-CD18 befinden. Dabei wurde jeweils ein Protein in den Klassen Zelltod und Zellteilung gefunden, zwei Proteine, welche in Zusammenhang mit Zelladhäsion, Zellmigration und dem Immunsystem stehen und vier Proteine, welche der Zellteilung zugeordnet sind. Des Weiteren wurde eine Übersicht der identifizierten differentiellen Proteine erstellt, welche in Zusammenhang mit Membranen gebracht werden (Tab. CD19). Diese Klassifizierungen wurden als Kriterium bei der Auswahl der Kandidatenproteine miteinbezogen.

### 5.3.9. Pathway-Analysen

Über das Online-Analyse-Programm „DAVID“ wurde eine funktionale Annotation der differentiellen Proteine der vier Bursastadien unter gleichzeitiger Auswertung ihrer Anreicherung in bestimmten Pathways („Gene enrichment analysis“), wie unter 4.5.14 beschrieben, durchgeführt. Dabei waren sieben Pathways signifikant stärker betroffen als es beim Vergleich einer zufällig erstellten Gen- oder Proteinliste mit dem Hühnergenom der Fall gewesen wäre (siehe Tab. 18).

**Tab. 18 Übersicht über Pathways mit angereicherten differentiellen Proteinen**

Nr.	Pathway	Pathway-Nr. (KEGG)	Involvierte Proteine	Involvierte Proteine / Gesamtzahl der Proteine (%)	P-Wert
1	Valine, leucine and isoleucine degradation	gga00280	6	3,51	1,38E-03
2	Proteasome	gga03050	5	2,92	7,04E-03
3	Glycolysis / Gluconeogenesis	gga00010	5	2,92	1,51E-02
4	Butanoate metabolism	gga00650	4	2,34	1,61E-02
5	Propanoate metabolism	gga00640	4	2,34	1,80E-02
6	beta-Alanine metabolism	gga00410	3	1,75	6,63E-02
7	Regulation of actin cytoskeleton	gga04810	8	4,68	8,40E-02

Während einige der Pathways allgemeine, allen Zellen eigene Stoffwechselvorgänge wie beispielsweise die Glycolyse oder den Abbau bestimmter Aminosäuren betreffen, erwies sich im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit der Pathway für die „Regulation des Aktin-Zytoskeletts“ als besonders interessant (siehe Abb. 30). Er enthält Proteine, welche in Zusammenhang mit Auf- und Abbauvorgängen des Zytoskeletts, Zellmigration und Zellteilung gebracht werden. Aus der Liste der differentell abundanten Proteine waren neun

Proteine in diesem Pathway angereichert, zwei davon, Actin 5 und Gelsolin wurden jeweils in drei verschiedenen Proteinspots gefunden (siehe auch Tab. CD11). Eine Übersicht der in diesem Pathway enthaltenen, differentiell abundanten Proteine ist in Tab. 19 aufgeführt.

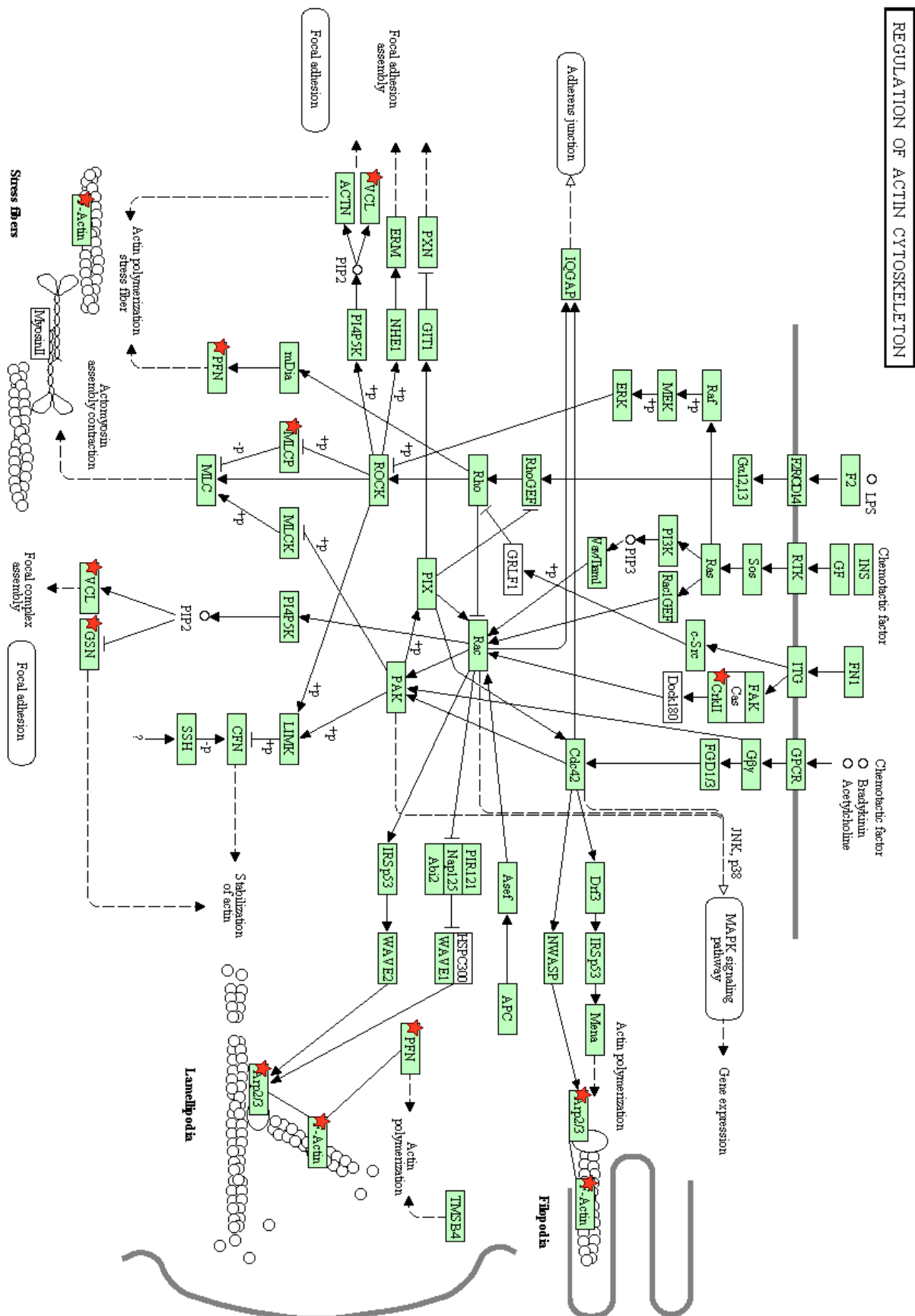
**Tab. 19 Angereicherte differentielle Proteine im Pathway „Regulation des Aktin-Zytoskeletts“**

Nr.	Proteinname	Gensymbol	Funktion	Spot-Nr.	Standardisierte Abundanzen in "DeCyder"			
					ET10	ET18	Tag2	Tag28
1	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	ARPC5	Regulation Aktin-Polymerisation	62	0,63	1,09	1,16	1,37
2	Actin, gamma 1	ACTG1	Interne Zellmotilität	20	1,18	1,17	0,93	0,84
3	Actin, cytoplasmic type 5	ACT5	Zellmotilität	17	0,65	0,81	0,96	0,65
				122	1,12	1,07	1,16	1,00
				131	0,33	0,55	1,54	1,10
				197	0,81	1,02	1,03	1,43
4	Gelsolin	GSN	Zelladhäsion, Aktinfilamentauf- und abbau, Apoptose	34	1,09	1,63	0,95	0,60
				41	0,60	1,53	1,07	0,69
				68	1,24	1,40	1,06	0,60
5	Profilin 2	PFN2	Aktinbindung	78	1,37	0,61	0,83	0,78
6	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	PPP1CC	Zellteilung	160	1,07	0,86	0,94	1,12
7	Scinderin	SCIN	Aktinfilament-Trennung	44	0,68	1,17	1,00	0,83
8	V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	CRKL	Aktivierung der RAS- und JUN-Kinase-Signalwege	169	1,55	1,02	0,77	0,63
9	Vinculin	VCL	Zelladhäsion, Zellmigration, Aufbau von Lammellipodien	42	1,64	1,57	1,02	0,46



**Abb. 30** Pathway für die Regulation des Aktin-Zytoskeletts

Dargestellt ist der KEGG-Pathway Nr. gga04810, „Regulation of Actin Cytoskeleton“. Alle Vierecke stehen jeweils für ein Genprodukt, die grün markierten Kästchen sind (auf der KEGG-Homepage) mit einer Gen-Nr. verlinkt. In diesem Pathway angereicherte Proteine der vier Entwicklungsstadien sind mit einem roten Stern markiert.



#### **5.4. Vergleich gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten**

Ein Vergleich der Datensätze aus dem gelbasierten 2D-DIGE-Experiment und den MS-basierten Proteomanalysen zeigte, dass sich 192 der 253 identifizierten differentiell exprimierten Proteine bzw. 76 % der Proteine aus der DIGE-Analyse auch in den MS-basierten Datensätzen der einzelnen Stadien wiederfinden ließen. Außerordentlich interessant war dabei, dass die mittels „Spectral Counting“ ermittelten, quantitativen Daten (siehe 5.2.3) der einzelnen Proteine der MS-basierten Analysen in ihren Verlaufskurven über die vier Entwicklungszeitpunkte häufig mit den Verlaufskurven des entsprechenden Proteins in der gelbasierten Analyse übereinstimmten. Tab. CD20 zeigt eine Zusammenstellung aller im DIGE-Experiment als differentiell abundant definierter und anschließend identifizierter Proteine, welche auch im MS-basierten Datensatz wiederzufinden sind. Dabei sind auf der Seite des 2D-DIGE-Experimentes die standardisierten Abundanzwerte der einzelnen Proteine für die verschiedenen Stadien, bezogen auf deren jeweiligen Maximalwert in Prozent dargestellt. Auf der Seite der MS-basierten Analysen ist die Anzahl der Peptid-Spektren, welche für die einzelnen Proteine ermittelt wurden, aufgeführt, ebenfalls in Prozent des maximalen Wertes jeder Reihe. Diese Prozentwerte wurden anschließend für jeden Zeitpunkt miteinander ins Verhältnis gesetzt, um Abweichungen feststellen zu können. Der beste dabei zu erreichende Wert bei einer Abweichung von 0 % lag somit bei 1. Die Grenzen für noch als ähnlich zu betrachtende Werte wurden bei einer Abweichung von  $\pm 30\%$  gesetzt. Sehr niedrige „Spectral Count“-Werte von unter 15 MS/MS-Spektren nicht berücksichtigt (siehe 5.2.3), erfüllten dieses Kriterium 60,7 % aller Vergleiche. Während bei einer Vielzahl der Proteine zumindest einer der vier Vergleichswerte mehr als 30% Abweichung zeigte, erfüllten 13 der 192 Proteine die Abweichungskriterien sogar für alle vier Entwicklungszeitpunkte (siehe Tab. 20). Bei diesen Proteinen ähnelt der Verlauf der gelbasierten Daten am stärksten dem Verlauf der durch „Spectral Count“ ermittelten Daten. Die Übereinstimmungen in diesem Vergleich können als Bestätigung für die richtige Identifizierung der differentiellen Spots aus der gelbasierten Proteomanalyse gewertet werden.

**Tab. 20 Vergleich der Verlaufsformen gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten**

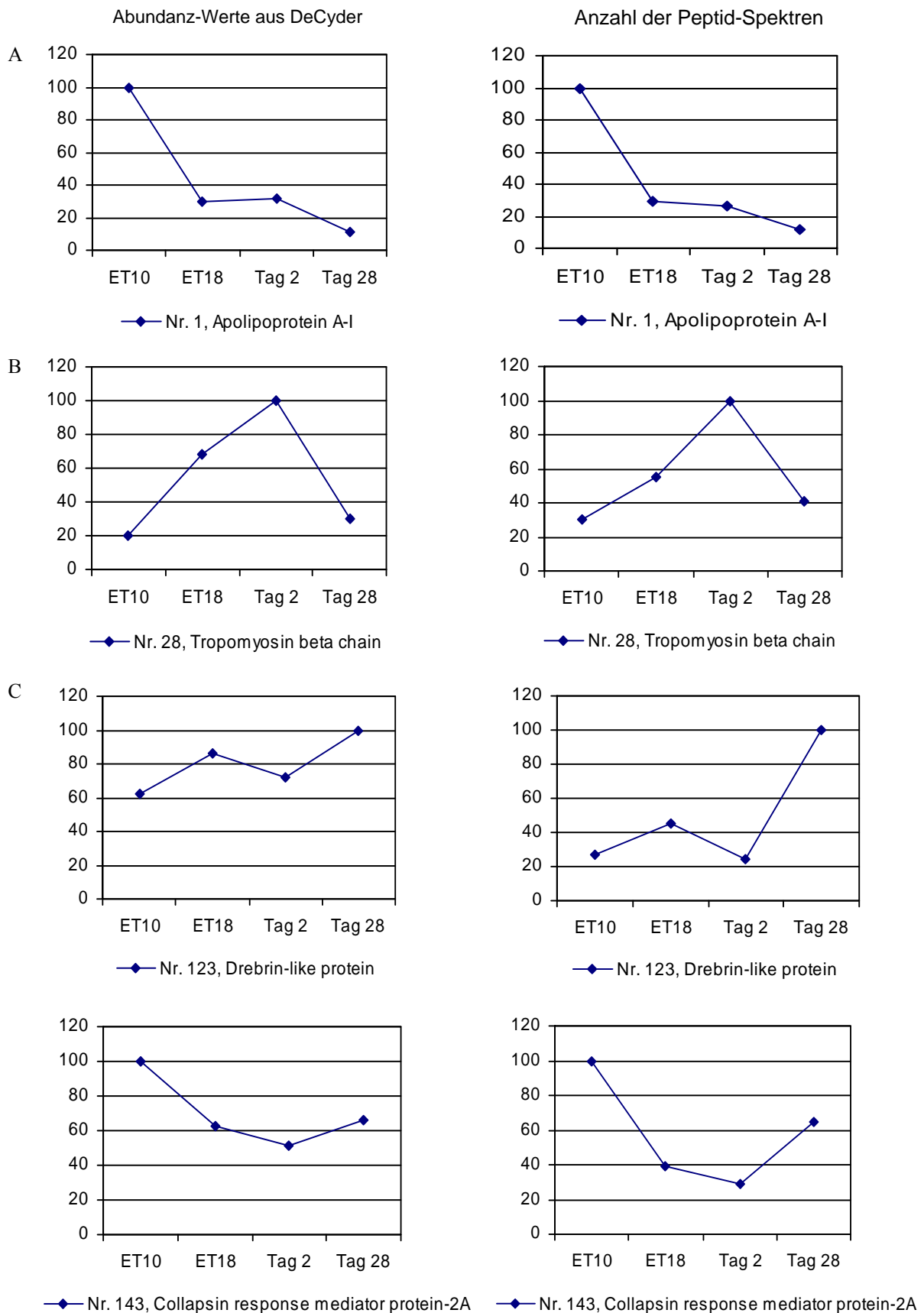
Dargestellt ist der Vergleich zwischen Daten der 2D-DIGE-Analyse auf der linken Seite, bestehend aus den Mittelwerten der standardisierten Abundanz aller biologischer Replikate für die einzelnen Spots zu jedem Entwicklungszeitpunkt aus „DeCyder“, bezogen auf den maximalen Wert der jeweiligen Zeile in Prozent. In der Mitte sind die Daten der MS-basierten Analysen aufgeführt. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der gemessenen Peptid-Spektren für ein bestimmtes Protein, bezogen auf den Maximalwert der Zeile in Prozent. Auf der rechten Seite wurden die jeweiligen Prozentwerte zueinander ins Verhältnis gesetzt.

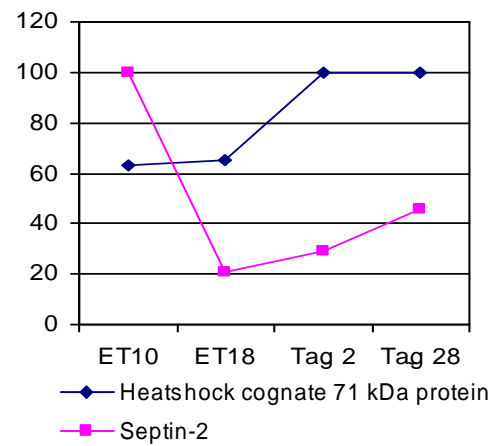
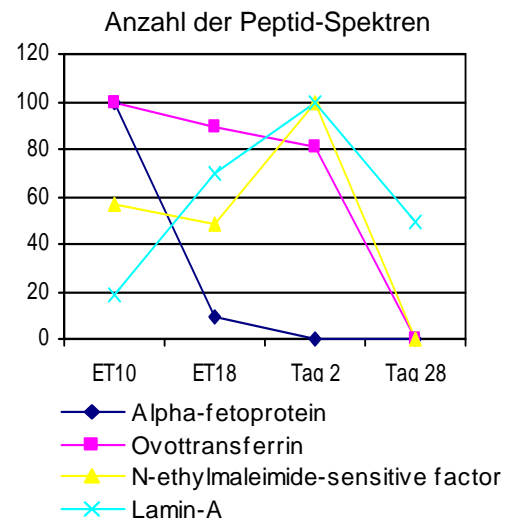
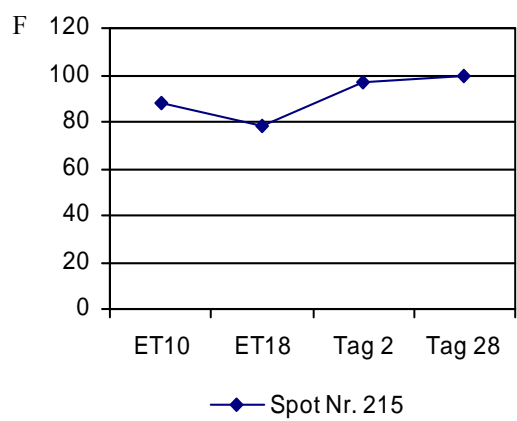
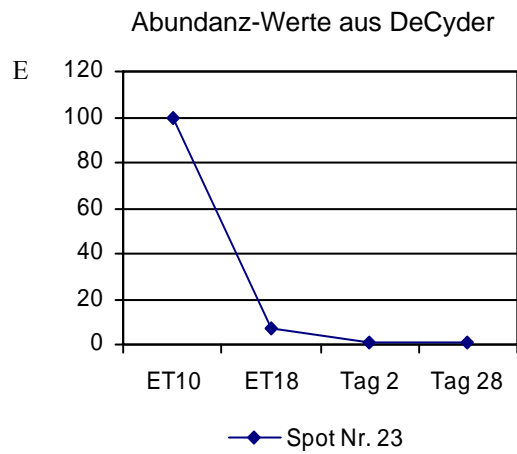
Spot-Nr.	Protein Name	Standardisierte Abundanzen der Spots (in % des Max-Wertes)				Anzahl der Peptid-Spektren (in % des Max-Wertes)				Verhältnis Spectral Counts zu Abundanzen			
		ET10	ET18	T2	T28	ET10	ET18	T 2	T28	ET10	ET18	T2	T28
17	Actin, cytoplasmic type 5	68	84	100	68	73	85	100	80	1,08	1,00	1,00	1,18
122	Actin, cytoplasmic type 5	97	92	100	86	73	85	100	80	0,75	0,92	1,00	0,93
130	Actin-like protein 6A	100	78	78	86	100	97	73	62	1,00	1,24	0,94	0,71
1	Apolipoprotein A-I	100	30	32	11	100	29	26	12	1,00	0,99	0,80	1,14
8	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	98	100	93	85	92	100	78	75	0,94	1,00	0,84	0,89
13	Fructose-bisphosphate aldolase C	92	100	94	88	94	73	100	78	1,02	0,73	1,06	0,88
215	Heatshock cognate 71 kDa protein	88	78	97	100	63	65	100	100	0,71	0,83	1,03	1,00
33	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	100	78	72	79	100	67	79	60	1,00	0,85	1,09	0,76
58	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	100	91	79	84	100	67	79	60	1,00	0,74	1,00	0,71
118	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	100	76	63	49	100	67	79	60	1,00	0,88	1,25	1,22
79	Protein DJ-1	75	81	84	100	81	100	71	77	1,07	1,23	0,84	0,77
24	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	44	84	91	100	40	65	73	100	0,91	0,77	0,80	1,00
47	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	46	87	92	100	40	65	73	100	0,87	0,75	0,78	1,00

Einige der Verlaufskurven wurden exemplarisch in Diagrammen dargestellt (siehe Abb. 31). Dabei wird deutlich, dass der Vergleich nicht nur als Bestätigung der Daten aus der gelbasierten Proteomanalyse dient, sondern im Falle von Mischpopulationen innerhalb eines dieser Spots auch Hinweise auf das Protein geben kann, welches vermutlich an der Abundanzveränderung für diesen Spot in „DeCyder“ beteiligt war. So liegt beispielsweise im Fall von Spot-Nr. 23 (siehe Abb. 31 E) die Vermutung nahe, dass es sich bei dem für das „DeCyder“-Expressionsprofil verantwortliche Protein um Alpha-Fetoprotein handelt sowie bei Spot Nr. 215 (siehe Abb. 31 F) um das 71 kDa schwere „heatshock cognate protein“.

**Abb. 31 Vergleich von Verlaufprofilen gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten**

A-F: Dargestellt sind Diagramme zum Vergleich von Verlaufprofilen der gelbasierten und MS-basierten Daten über die vier Entwicklungszeitpunkte hinweg. Links sind die Abundanzwerte aus „DeCyder“ aufgeführt, rechts die Anzahl der gemessenen Peptid-Spektren der Proteine aus den qualitativen Analysen. Der Maximalwert wurde jeweils auf 100 % gesetzt, die übrigen Werte sind prozentuale Anteile in Bezug auf den Maximalwert.





## **6. DISKUSSION**

### **6.1. Einführung**

Die B-Zellentwicklung beim Haushuhn, als einem seit über 50 Jahren etablierten Modelltier für immunologische Studien, ist bisher in groben Zügen charakterisiert sowie den chronologischen Ablauf betreffend in eine präbursale, bursale und postbursale Phase unterteilt worden [25]. Über die molekularen Voränge der B-Zellentwicklung ist jedoch, von der Charakterisierung der B-Zellrezeptor-Diversifizierung [13, 33] einmal abgesehen, nur sehr wenig bekannt. So bleibt die Frage nach möglichen regulatorischen Faktoren, welche B-Zelleinwanderung, -reifung, und -emigration steuern könnten, sowie Faktoren, welche Einfluß auf die Entscheidung über Proliferation oder Apoptose und damit das Schicksal der individuellen B-Zelle haben, bisher offen. Die Suche nach Antworten auf diese Fragestellungen bildete die Grundlage dieser Arbeit und ist auch im Hinblick auf das Huhn als Modelltier für viele GALT-Spezies interessant [14-15]. Zur Untersuchung der molekularen Vorgänge während der B-Zellentwicklung in der Bursa Fabricii des Haushuhns bietet die moderne Proteomik mit Techniken wie 2D-DIGE und massenspektrometrischen Analysen hervorragende holistische Ansätze. Die Anwendung dieser Methoden in der vorliegenden Arbeit ermöglichte es, Veränderungen auf Proteinebene innerhalb des definierten Gewebes der Bursa Fabricii zu den vorher festgelegten, repräsentativen Entwicklungszeitpunkten zu detektieren.

### **6.2. Auswahl der proteomischen Analyseverfahren**

Sollen molekulare Mechanismen untersucht werden, welche eine Rolle in der Entwicklung von Zellen, der Ontogenese von Organen oder ganzer Organismen spielen, muss zunächst ein geeigneter Ansatz gewählt werden, welcher die innerhalb dieser Entwicklung auf molekularer Ebene stattfindenden Veränderungen am besten charakterisiert. In dieser Arbeit wurde die Proteomik zur Analyse dieser Vorgänge verwendet, ebenso denkbar (und in einer parallelen Arbeit „Transkriptomische Analyse der Bursa Fabricii des Huhns zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten“ von S. Schmieder durchgeführt) ist eine Herangehensweise durch transkriptomische Techniken. Sowohl die Untersuchung von Expressionsmustern auf Protein- als auch auf Transkriptebeine können einzeln betrachtet jeweils nur einen kleinen Teilbereich der tatsächlich stattfindenden molekularen Veränderungen abbilden und sollten demnach

möglichst in Zusammenhang betrachtet werden. Auch zeigt die Proteinexpression in Geweben sehr oft keine Übereinstimmung mit der Expression von transkribierter Messenger-RNA [65]. Die Ergebnisse von proteomischen Analysen sind daher nicht als Bestätigung bereits generierter transkriptomischer Daten, sondern als zu diesen komplementäre, eigenständige Aussage über die molekularen Vorgänge auf Proteinebene zu werten. Dies ist insbesondere daher von Bedeutung, weil ein gefundenes Transkript noch keinesfalls eine Aussage darüber zulässt, ob zu diesem oder einem späteren Zeitpunkt im selben Gewebe auch tatsächlich das zugehörige Protein vorhanden ist. Auch geben transkriptomische Daten keinerlei Aufschluss über den Beginn und das Ende einer Proteinsequenz, molare Masse oder Ladung eines Proteins sowie dessen Abundanz innerhalb einer Zelle oder eines definierten Gewebes. Ebenso wenig können regulatorisch bedeutsame, posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen transkriptomisch erfasst werden. Daher bietet die Proteomik eine einzigartige Möglichkeit, strukturelle und funktionell genomische Ansätze zu komplementieren und dadurch zur Überbrückung der „Lücke zwischen Sequenz und Phänotyp“ [65] beizutragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die 2D-DIGE-Technologie gekoppelt mit MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie für quantitative Proteomanalysen repräsentativer Entwicklungsstadien der Bursa Fabricii verwendet. Zusätzlich wurden qualitative Proteomanalysen per 1D-SDS-PAGE gefolgt von LC-MS/MS für dieselben bursalen Stadien sowie für aufgereinigte B-Zellen durchgeführt.

### **6.2.1. 2D-DIGE**

Bei der 2D-DIGE-Technologie handelt es sich um ein Proteinmarkierungs- und Trenn-Verfahren, welches zur Quantifizierung zweier oder mehrerer Proben durch optische Detektierung der Fluoreszenz unterschiedlich gelabelter und auf einem 2D-Polyacrylamid-Gel gemeinsam elektrophoretisch aufgetrennter Proteingemische verwendet wird [91]. Auf einem dieser 2D-Gele können theoretisch bis zu 10.000 Proteine aufgetrennt und detektiert werden, wobei in der 1. Dimension nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine und in der 2. Dimension nach deren Molekulargewicht getrennt wird. Die ursprüngliche Intention, welche zur Entwicklung der 2D-Gele führte, war die Suche nach einer Möglichkeit, Veränderungen in Zellproteomen durch Mutationsereignisse, beispielsweise im Vergleich zwischen Krebszellen und gesunden Zellen, detektieren zu können [92]. Dies gestaltete sich aufgrund der hohen Intergelvarianzen herkömmlicher 2D-Gele jedoch sehr schwierig, weshalb der Gedanke aufkam, mehrere Proben gleichzeitig auf einem Gel aufzutrennen, um diese technischen Varianzen zu umgehen. Durch den Einsatz verschiedener fluoreszenter Label

wurde die Auftrennung von bis zu drei verschiedenen Proben auf einem Gel möglich – der Grundgedanke von DIGE war geboren. Estmals beschrieben wurde diese neue Methode der Proteinseparation und -quantifizierung 1997 von Ünlü et al., welche die Vorteile der Kombination von 2D-Gelelektrophorese und fluorezenzbasierter Detektion von Proteinen zusammenfassten [93]. Eines der Hauptziele bei der Entwicklung von DIGE war es, die üblicherweise sehr schlechte Reproduzierbarkeit der 2D-Gele zu verbessern, welche akkurate quantitative Vergleiche zwischen Proteinen auf verschiedenen Gelen sehr schwer macht. Mit der DIGE-Technologie sind die Proben während ihrer Verarbeitung denselben Verarbeitungsprozessen und Mikroumgebungen ausgesetzt, was einen positiven Einfluß auf die Reproduzierbarkeit zur Folge hat [92]. Des Weiteren führte die Einführung des „Internal Pooled Standard“ (IPS) in seiner Funktion als Ladekontrolle zu einer enormen Zunahme der Genauigkeit der relativen Quantifizierung von Proteinspots zwischen den einzelnen Gelen sowie zu einer Reduktion der systematischen Varianz [93-94].

DIGE wurde bereits für die Bewertung von proteomischen Veränderungen in einer Vielzahl von Anwendungsbereichen verwendet. Diese reichen von der Entwicklung verschiedenster ganzer Organismen im Sinne von „whole organism proteomics“ [95], über die proteomische Studien einzelner Gewebe [96] und Körperflüssigkeiten [97] bis hin zur Untersuchung einzelner subzellulärer Kompartimente [98].

Die DIGE-basierte, vergleichende Proteomik hat auf unser heutiges Verständnis der physiologischen Entwicklung einer Reihe von Organismen sowie der Effekte, welche Krankheiten, Mutationen und andere Umwelteinflüsse auf die Proteome dieser Organismen haben, einen entscheidenden Einfluss gehabt. Dennoch ist es wichtig zu beachten, dass derzeit keine proteomische Technik in der Lage ist, das gesamte Proteom eines höheren Organismus, eines Gewebes oder einer einzelnen eukaryotischen Zelle abzubilden, sondern dass lediglich die prominentesten Proteine und ihre quantitativen Veränderungen zwischen verschiedenen Stadien detektiert werden können [92].

Ein Vorteil der Verwendung von 2D-DIGE in Studien über Entwicklungsprozesse ist, dass sich mit dieser Technik gut Regulationen in Protein-Expressionsprofilen über mehrere Zeitpunkte hinweg darstellen lassen. Weitere Vorteile sind die hervorragende Auftrennung hochkomplexer Proteingemische mit einem Trennbereich von über 10.000 Proteinen pro Gel, sowie die im Gegensatz zu absorptionsbasierten Quantifizierungsmethoden mit Silber- oder Coomassie exaktere und reproduzierbarere fluoreszenzbasierte Quantifizierung, welche mit einem Detektionsminimum von unter einem Femtomol Protein extrem sensitiv ist [99].



Natürlich beinhaltet die Verwendung der 2D-DIGE-Technologie auch einige Nachteile, die hier nicht außer Acht gelassen werden sollen. So erlauben 2D-Gele meist nicht die Auflösung sehr großer Proteine über 150 kDa oder sehr kleiner Proteine unter 10 kDa oder sehr basischer oder hydrophober Proteine und limitieren so die Abdeckung der in einer biologischen Probe detektierbaren Proteine [91]. Des Weiteren sind 2D-Gele trotz geeigneter Gegenmaßnahmen wie des IPS ein grundsätzlich variables System. Diese Variabilität muss durch die Verwendung mehrerer biologischer Replikate kompensiert werden, was zu einem erhöhten Arbeitsaufwand führt [91]. Außerdem ist zu beachten, dass nicht alle in den Gelbildern detektierten Proteinspots nachfolgend auch tatsächlich aus einem präparativen Gel massenspektrometrisch identifiziert werden können. In der Regel ist nur ein Teil der differentiell abundanten Proteinspots eines Experimentes eindeutig identifizierbar. Auf der anderen Seite können aus einigen so genannten „Mischspots“, also Spots, die mehrere Proteine mit gleicher molarer Masse und gleichem isoelektrischen Punkt enthalten, valide Identifizierungen hervorgehen. Dies führt dazu, dass die Intensitätsveränderung eines Spots nicht eindeutig einem einzelnen der identifizierten Proteine zugeordnet werden kann.

Als Alternativen zu DIGE für die Anwendung in der quantitativen Proteomik sind verschiedene Massenspektrometrie-basierte Quantifizierungsmethoden auf Peptidebene zu nennen. Zur exakten Quantifizierung der tryptischen Peptide dienen hierbei meist Markierungstechniken, z.B. mit stabilen Isotopen wie  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$ . Dabei können zwei zu vergleichende Proben mit so genannten „Tags“ unterschiedlicher molarer Masse, aber gleicher chemischer Struktur und Zusammensetzung markiert und dann als Gemisch gleichzeitig aufgetrennt und massenspektrometrisch quantifiziert und identifiziert werden, wie beispielsweise bei der iTRAQ-Methode (iTRAQ = isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) [100]. Bei der SILAC-Technik (Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture), werden isotopenmarkierte Aminosäuren bereits auf der Ebene der Proteinsynthese eingebaut, eine Technik die sich jedoch nur für die Verwendung in Zellkultur eignet [101]. Bei den so genannten „label-free“-Methoden werden dagegen bestimmte Eigenschaften der MS/MS-Fragment-Ionen wie deren aufsummierte Signalintensität während der Elution von der Reversed-Phase-Chromatographiesäule [102], die Fläche unter den Peaks eines Peptidions [103] oder die Gesamtanzahl erfasster MS/MS Spektren von proteotypischen Peptiden [104] zwischen verschiedenen Proben verglichen. Letztere Methode ist, seitdem durch Washburn et al. erstmals ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der MS/MS-Identifizierungen eines Proteins und dessen Abundanz in einer Probe nachgewiesen werden konnte [105], auch unter dem Begriff „Spectral Counting“ bekannt.

All diese MS-basierten Methoden der Proteinquantifizierung erfreuen sich in den letzten Jahren wachsender Beliebtheit, da sie besser automatisierbar und weniger zeitintensiv sind als gelbasierte Methoden wie beispielsweise 2D-DIGE [106]. Ein entscheidender Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass die Proteinquantifizierung üblicherweise auf niedermolekularer Peptidebene stattfindet. Bei diesen auch als „Shotgun proteomics“ bezeichneten Methoden werden die Proteine zunächst zu Peptiden gespalten, das Peptidgemisch nachfolgend aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert [106]. Die Quantifizierung auf Peptidebene führt zur Einführung eines weiteren Interferenzschrittes, um die eigentlich gewünschte Information über die quantitativen Verhältnisse der in den Proben enthaltenen Proteine zu erhalten. Dieser weitere Schritt der Informationsübertragung birgt Fehlerquellen, da viele tryptische Peptide aufgrund von evolutionärem Recycling von Proteindomänen, und damit dem Bestehen vieler unterschiedlicher Proteine ähnlicher Sequenz, mehrfach im Proteom vorkommen, also nicht proteotypisch sind [107]. Ebenso gehen durch die Proteolyse der Proteine wichtige Informationen bezüglich der Unterscheidung verschiedener Proteinisoformen verloren, welche bei gelbasierten Methoden wie 2D-DIGE erhalten bleiben [91]. Ein weiterer Nachteil der meisten MS-basierten Methoden ist der relativ niedrige dynamische Bereich der messbaren Abundanzveränderungen der Peptide von weit unter  $10^3$  [91]. Aus diesen Gründen stellen Labelingtechniken, welche eine Auswertung auf Proteinebene mit einem hohen dynamischen Bereich der Quantifizierung erlauben, wie es bei 2D-DIGE der Fall ist, gute Alternativen zu den MS-basierten Methoden dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 2D-DIGE in Bezug auf eine akkurate Proteinquantifizierung den MS-basierten Methoden mindestens gleichzusetzen ist. Es bietet des Weiteren einige Vorteile, wie einen hohen dynamischen Bereich der Detektion und Quantifizierung, extreme Sensitivität und die Möglichkeit der Detektion intakter Proteine und damit der Generierung von Informationen über Proteinisoformen. Aufgrund dieser Vorteile, sowie der Eigenschaften des gegebenen Probenmaterials, wurde in dieser Arbeit 2D-DIGE zur Erstellung der differentiellen Proteomanalysen ausgewählt.

### **6.2.2. LC-MS/MS**

Neben den differentiellen Proteomanalysen der Bursa Fabricii zu den unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten wurden zusätzlich qualitative proteomische Analysen derselben Stadien durchgeführt sowie ein Proteom aus aufgereinigten bursalen B-Zellen erstellt. Dies geschah zum einen, um die Gesamtanzahl an identifizierten Proteinen aus den proteomischen Analysen zu erhöhen, da lediglich die differentiell abundanten Proteinspots der Gele aus dem 2D-DIGE-Experiment zur Identifikation vorgesehen waren. So erhöhte sich die Anzahl der

identifizierten Proteine eines Entwicklungszeitpunktes durch den Einsatz der qualitativen Proteomik um ein fünffaches. Andererseits sollte mit der Analyse des Proteoms reiner B-Zellen die Möglichkeit geschaffen werden, Hinweise auf die Zugehörigkeit eines differentiell abundanten bursalen Proteins zu den unterschiedlichen bursalen Kompartimenten „Stroma“ oder „B-Zelle“ zu erhalten. So konnten beispielsweise über die vier Entwicklungszeitpunkte ansteigend abundante Proteine, welche auch im Proteom der B-Zellen gefunden wurden, unter diesem Aspekt betrachtet werden, um etwaige Fehlinterpretationen hinsichtlich einer differentiellen Expression dieser Proteine zu vermeiden. Es wurde in Betracht gezogen, dass die erhöhte Abundanz des betreffenden Proteins auch durch die vermehrte Einwanderung und Proliferation von B-Zellen im Verlauf der Bursa-Entwicklung und nicht durch „echte“ Expressions-Veränderungen bedingt sein könnte. Diese kritischen Betrachtungen bildeten eine wichtige Grundlage für die nachfolgende Kandidatenselektion.

### **6.3. Grenzen der gewählten Analyseverfahren**

In der B-Zell-Entwicklung kommen Zell-Zell-Interaktionen durch membranständige Rezeptoren und deren Liganden, wie beispielsweise dem Immunglobulin-Rezeptor [41], dem CD40-CD40L-System [63], Zytokinen wie BAFF [50] oder Zuckerstrukturen wie beispielsweise Sialyl Lewis X oder Lewis X [35] große Bedeutung zu. Bei diesen Proteinen handelt es sich jedoch zumeist um niedermolekulare Moleküle, welche in Gewebeproben nur in sehr geringer Abundanz vorkommen, und daher in gelbasierten proteomischen Ansätzen nur sehr selten erfasst werden können. Vor allem Plasmamembranproteine sind aufgrund ihrer naturgegebenen niedrigeren Abundanz sowie der schlechten Löslichkeit in herkömmlichen Reagenzien im Vergleich zu den zytosolischen Proteinen in den meisten proteomischen Studien unterrepräsentiert [108]. Gelbasierte Methoden wie 1D-SDS-PAGE oder auch 2D-DIGE sind grundsätzlich nur sehr limitiert zur Analyse von Membranproteinen geeignet. Die schlechte Löslichkeit von basischen und hydrophoben Proteinen und Probleme bei der Detektion von Proteinen niedriger Abundanz machen die gelbasierte Analyse von Membranproteinen zu einer der großen Herausforderungen in der Proteomik [108]. Auf der anderen Seite stehen höher abundante und besser lösliche zytosolische Proteine in den meisten Proteomanalysen im Vordergrund, so dass spezielle Anreicherungs- und Aufreinigungsverfahren für die Detektion von Membranproteinen nötig sind. Generell führen Subfraktionierungen der Proben zu einer Reduktion der Komplexität in den einzelnen Fraktionen und erhöhen damit die Chance, auch niedrig abundante Proteine identifizieren zu können [109]. Des Weiteren haben sich spezielle Anreicherungsverfahren für

Membranproteine bewährt, welche diese aufgrund ihrer Hydrophobizität (mittels Dextran [110] oder TritonX [111]) oder Dichte (mittels Succrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation [112]) von den anderen Fraktionen trennen. Diese Methoden führen in Verbindung mit zusätzlichen Waschschritten mit Lösungen hohen Salzgehaltes oder hohen pH-Wertes zur Entfernung der zytosolischen Proteine [113] zu einer ersten Anreicherung von Membranproteinen in der behandelten Probe. Da die so erhaltenen Konzentrationen an Membranproteinen jedoch für die meisten Analysen nicht ausreichend sind, schließen sich daran zumeist noch verschiedene Techniken der Membranprotein-Aufreinigung an. Zu nennen sind hier das „Crosslinking“ von Plasmamembran-Komplexen gefolgt von größenabhängiger Chromatographie oder Immunopräzipitation [114], „Cell Shaving“ von Oberflächenproteinen durch bestimmte Proteasen [115], oder Affinitätsanreicherungen über Biotinilierung. Des Weiteren kann die posttranslationale Glykosilierung vieler Plasmamembranproteine für deren Aufreinigung durch Bindung an Lektine wie ConA oder Agglutinine aus Soja oder Weizen genutzt werden [116].

Die gegebene Übersicht über die äußerst diffizile Problematik der proteomischen Analysen von Membranproteinen soll als mögliche Erklärung für die auch in dieser Arbeit sehr begrenzte Anzahl an identifizierten membranständigen Proteinen dienen. Es wurde jedoch bewusst auf die Verwendung von gezielten Anreicherungs- und Aufreinigungsverfahren für Membranproteine verzichtet, da hier in einem ersten Ansatz ein Überblick über die Gesamtheit der sich verändernden Proteine in bursalem Gewebe geschaffen werden sollte. Es wurde nicht speziell nach Membranproteinen sondern nach Faktoren jeglicher Herkunft gesucht, welche die B-Zellentwicklung steuern könnten. Die Verwendung der oben genannten Techniken zur gezielten Suche nach differentiell regulierten Plasmamembranproteinen stellt jedoch sicherlich eine lohnenswerte Strategie für zukünftige Studien zur Vertiefung der gewonnenen Daten dar. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise die Isolation von Membranproteinen aufgereinigter B-Zellen zu den verschiedenen Entwicklungszeitpunkten, gefolgt von MS-basierter Quantifizierung.

Abgesehen von den methodischen Grenzen dieses Projektes waren der Auswertung der Daten auch technische Grenzen durch die noch nicht sehr weit fortgeschrittene Annotation des Hühnergenoms gesetzt. Mit einer zunehmenden Verbesserung der Proteindatenbankeinträge für das Huhn können jedoch einmal erzeugte Daten jederzeit erneuten Analysen unterzogen werden. Dadurch können heute gewonnene Datensätze wie der hier vorliegende noch besser ausgewertet werden oder unter dem Licht einer völlig neuen Fragestellung betrachtet werden.

## **6.4. Betrachtung der Ergebnisse**

### **6.4.1. Festlegung der Probenentnahmezeitpunkte**

Auf Grund der publizierten Daten zur bursalen Embryonalentwicklung wurden die Proben an Embryonaltag 10 (ET10), Embryonaltag 18 (ET18), Tag 2 und Tag 28 nach dem Schlupf gewonnen. Der erste Zeitpunkt fällt in die Phase der Einwanderung der B-Zellen in die Bursaanlage zwischen ET8 und ET14, der zweite in die Phase von Gene Conversion, Proliferation und Apoptose der B-Zellen, jedoch ohne Immigration oder Emigration der B-Zellen. Die letzten beiden Zeitpunkte spiegeln die Emigration der B-Zellen aus dem noch unreifen Organ kurz nach dem Schlupf bzw. dem ausgereiften Organ wider. Es stellte sich heraus, dass diese Auswahl für die quantitativen proteomischen Analysen gut geeignet war, da die Expressionsprofile einer Vielzahl von Proteinen deutliche Unterschiede zwischen diesen einzelnen Zeitpunkten zeigten.

### **6.4.2. Qualitative Proteomik**

Die qualitativen proteomischen Analysen erfolgten mittels Vorfraktionierung der Bursalysate sowie des B-Zell-Lysats durch 1D-SDS-PAGE und nano-HPLC gefolgt von Tandem-MS-Analysen in einer linearen Ionenfalle. Hierbei konnten für die bursalen Proteome zu jedem Zeitpunkt zwischen 1152 und 1392 Proteine identifiziert werden. Bei laborinternen Erfahrungswerten von ca. 1000 identifizierten Proteinen pro 50 µg eingesetztem Probenmaterial für Gewebe ist diese Ausbeute als gut zu erachten. Von den insgesamt 2214 identifizierten Proteinen wurden 2062 beim Huhn erstmals auf Proteinebene detektiert, d.h. diese Proteine waren bisher lediglich durch die Ableitung transkriptomischer Daten oder homologer Proteine anderer Spezies in der UniProt-Datenbank gelistet.

Beim Vergleich der einzelnen bursalen Stadien untereinander wurde festgestellt, dass die nachfolgenden Zeitpunkte sich in ca. 800 Proteinen überschneiden, während alle Stadien zusammen genommen nur ca. 537 Proteine gemeinsam hatten. Es stellte sich heraus, dass diese Überschneidungen v.a. durch Proteine bedingt waren, welche an allgemeinen Struktur- und Stoffwechselvorgängen von Zellen beteiligt sind. Es fanden sich darunter beispielsweise Enzyme des Zucker- und Fettstoffwechsels, der Proteolyse, solche für RNA-Prozessierung oder Translation, Bausteine für bestimmte Zellbestandteile wie den Proteasom-Komplex oder Mitochondrien sowie eine Vielzahl von Bindungsproteinen.

Aus dem durch MACS aufgereinigten B-Zell-Lysat wurden insgesamt 758 Proteine identifiziert, von denen 684 im Huhn noch nicht auf Proteinebene beschrieben waren. Diese

im Vergleich zu den Bursalysaten etwas geringere Ausbeute könnte durch die erhöhte Homologie der Probe durch die Aufreinigung bedingt sein, welche sich bei der Identifizierung zugunsten der abundantesten Proteine auswirkt.

In einer vergleichenden Analyse mit dem Gesamtbursa-Proteom stimmten die B-Zell-Proteine zu einem großen Teil (647 Proteine) mit denen der Bursastadien überein, während sich nur 111 Proteine der B-Zellen nicht in den Bursaproben wiederfanden. Auf der Seite des Gesamtbursa-Proteoms wurden 1725 Proteine identifiziert, welche nicht in der B-Zell-Probe nachweisbar waren. Es war daher anzunehmen, dass diese Proteine mit einer höheren Wahrscheinlichkeit aus dem Bursastroma statt aus den B-Zellen selbst stammten, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie in der B-Zell-Probe lediglich unterhalb der Nachweisgrenze lagen oder in der Identifizierung durch höher abundante Proteine verdrängt wurden. Die Zuordnung eines Proteins zu den bursalen Kompartimenten „B-Zelle“ und „Stroma“ wurde in die spätere Kandidatenselektion mit einbezogen.

Die Verteilung der identifizierten bursalen Proteine sowie der B-Zell-Proteine auf die genontologischen Gruppen „intrazellulär“ (70 % bzw. 81 %), „membranständig“ (22 % bzw. 18 %), und „extrazellulär“ (8 % bzw. 1 %) entsprach den Erwartungen an ein gelbasiertes Analyseverfahren. Auf die Ursachen für die vergleichsweise geringe Anzahl an identifizierten Membranproteinen mittels der verwendeten gelbasierten Auftrennungstechniken wurde bereits ausführlich unter 6.3 eingegangen. Auch das Fehlen klassischer Zytokine der B-Zellentwicklung wie unter 2.2.3 beschrieben, ist wahrscheinlich durch deren geringe Abundanz, welche vermutlich unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methoden liegen dürfte, bedingt.

Eine weitere genontologische Einteilung der zu den verschiedenen Entwicklungszeitpunkten und in der B-Zellprobe identifizierten Proteine in die Gruppen „Zellteilung“, „Zellwachstum“, „Zelltod“, „Zelladhäsion“, „Zellmigration“ und „Immunsystem“ zeigte, dass für das Zellwachstum verantwortliche Proteine v.a. zu den frühen Zeitpunkten zu finden waren, während Proteine, welche eine Rolle für das Immunsystem spielen, eher zu späteren Entwicklungszeitpunkten in Erscheinung traten. Dies spiegelt gut die Entwicklung der Bursa von der, während den frühen Stadien noch unreifen, embryonalen Wachstums- und Differenzierungsprozessen unterliegenden Bursaanlage, zum später fertig ausdifferenzierten, primär-lymphatischen Organ wider. Die B-Zellen zeigten besonders hohe Anteile an Proteinen, welche für Zellteilung verantwortlich sind, ein Ergebnis, welches konform zu den hohen Proliferationsraten der B-Zellen während der Bursaentwicklung ist. Proteine, welche der Zellmigration zugeordnet werden, fanden sich vermehrt an ET10 sowie in den B-Zellen.

Dies kann als Hinweis auf eine vermehrte Beteiligung dieser Proteine an der Einwanderung der B-Zellen in die Bursaanlage zwischen ET8 und ET14 betrachtet werden.

Es fanden sich in den qualitativen Analysen dieser Arbeit auch einige der Proteine, welche bereits von McCarthy et al. in ihrer Studie des Bursaproteoms beschrieben wurden [79] (siehe 2.3.3), wie die Apoptose-relevanten Proteine „Fas-associating death domain-containing protein“ (FADD), Caspase 3, Lamin A und B, der „BH3-interacting domain death agonist“ (BID) sowie verschiedene Formen von Aktin. Aufgrund des unterschiedlichen experimentellen Designs ist ein direkter Vergleich der generierten Daten jedoch schwierig. So untersuchten McCarthy et al. unterschiedliche Zellfragmente wie Membran, Zytosol und Kern von bursalen Stromazellen und bursalen B-Zellen mittels differentieller Detergenz-Fraktionierung zum Zeitpunkt von drei Wochen nach dem Schlupf. In der vorliegenden Arbeit wurde keine Fragmentierung der Proben vorgenommen, jedoch dafür qualitative Proteomanalysen der Bursa Fabricii zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten durchgeführt. Durch die Fragmentierung konnte in der Studie von McCarthy et al. mit insgesamt 5198 Proteinen aus allen Kompartimenten zwar eine höhere Anzahl an Identifizierungen für den gewählten Zeitpunkt erreicht werden als in der vorliegenden Arbeit, diese jedoch nicht hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu den verschiedenen Phasen der Bursaentwicklung zugeordnet werden.

#### **6.4.3. Quantitative Proteomik**

Um die Protein-Expressionsprofile der Bursa Fabricii zu den vier gewählten Entwicklungszeitpunkten quantitativ zu vergleichen und damit Hinweise auf mögliche Faktoren für die B-Zellreifung und -funktion zu erhalten, wurde eine differentielle Proteomanalyse mittels 2D-DIGE durchgeführt. Dies erfolgte in einem umfangreichen Experiment mit je sechs biologischen Replikaten für jeden der vier Entwicklungszeitpunkte und jeweils drei technischen Replikaten für jede Probe. Für die Detektion einer 2-fachen bis 1,5-fachen Veränderung der Proteinexpression sind üblicherweise drei bis fünf biologische Replikate nötig [117]. In dem hier verwendeten experimentellen Design mit sechs biologischen Replikaten war es dadurch möglich noch subtilere Veränderungen der Proteinexpression als statistisch signifikant zu erfassen. Die technischen Replikate wurden angefertigt um sicherzustellen, dass nur die Gelbilder der jeweils am besten 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennten Lysate zur folgenden „DeCyder“-Analyse verwendet wurden. Aufgrund möglicherweise vorhandener Protein-spezifischer Markierungspräferenzen bestimmter Proteine zu einem der Fluoreszenzfarbstoffe, wie sie beispielsweise in einer Studie mit mehr als 1,4-fachen Dye-spezifischen Schwankungen für 6 % der untersuchten

Proteine beschrieben wurden [118] und welche somit die Genauigkeit der Quantifizierung beeinträchtigen können, wurde ein Wechsel der Farbstoffe, ein so genannter „Dye Swap“ nach jeweils drei Replikaten für alle Proben durchgeführt.

Die erstellte statistische Auswertung in „DeCyder“ mittels „Principal Component Analysis“ und „Heatmap“ ließ erkennen, dass die einzelnen Entwicklungszeitpunkte deutlich voneinander abgrenzbare Gruppen bildeten, in denen jeweils alle sechs biologischen Replikate eines Entwicklungszeitpunktes vertreten waren. Dies deutet darauf hin, dass sich die bursalen Proteome der verschiedenen Entwicklungszeitpunkte deutlich voneinander unterscheiden. Die Ähnlichkeit der biologischen Replikate innerhalb eines Zeitpunktes spricht dabei für die Reproduzierbarkeit der Unterschiede zwischen den vier Stadien. Weiterhin ging aus den Analysen hervor, dass sich die deutlichsten Unterschiede zwischen ET10 und allen weiteren Zeitpunkten zeigten, sowie Tag 2 und Tag 28 innerhalb der restlichen Zeitpunkte näher beieinander lagen als zu ET18.

Weiterhin wurden Gruppenvergleiche der einzelnen Stadien mit Student's T-test durchgeführt, welche aufgrund des statistischen Auswertungsverfahrens eher stark veränderte Kandidaten hervorbringen, während die zusätzlich verwendete „Multiple Comparision“ über alle Entwicklungszeitpunkte hinweg nach Mustern innerhalb der Expressionsveränderungen sucht und damit auch subtilere Änderungen erfasst [92]. Die Verwendung des Student's T-Tests führt bei einer großen Anzahl an statistischen Einzeltests zu einer Anreicherung von falsch positiven Aussagen [119], weshalb die FDR bei Experimenten mit beispielsweise Tausenden von Einzelergebnissen nach unten korrigiert werden muss. Dies ist in der vorliegenden Arbeit mittels der „FDR-correction“ in „DeCyder“ erfolgt. Für die Gruppenvergleiche zwischen den einzelnen Stadien wurden mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$ , „Average Ratios“ von mindestens  $\pm 1,5$  und der Tatsache, dass die Spots auf allen 36 Gelbildern vorhanden sein mussten, sehr stringente Kriterien angewendet. Dabei ergaben sich für den Vergleich von ET10 und ET18 155 differentiell abundante Proteine, beim Vergleich von ET18 und Tag 2 11 Proteine und zwischen Tag 2 und Tag 28 33 signifikant veränderte Proteine. Auch hier wurde deutlich, dass die meisten Änderungen auf Proteomebene zu den frühen Entwicklungszeitpunkten statt fanden.

Bei einer anschließenden „Multiple Comparison“, also einem Vergleich der Proben über die vier verschiedenen Entwicklungszeitpunkte hinweg mittels One-way-ANOVA, ergab sich eine Anzahl von 402 differentiell exprimierten Proteinspots, zu deren Auswahl dieselben strengen Kriterien herangezogen wurden wie für die Gruppenvergleiche.



Bei Betrachtung der einzelnen differentiell abundanten Proteinspots im Vergleich zwischen den vier Entwicklungsstadien konnten unterschiedliche wiederkehrende Expressionsmuster detektiert werden. Darunter waren sowohl über die einzelnen Zeitpunkte ansteigende als auch fallende Verlaufskurven. Des Weiteren zeigten sich auch Profile, die zu den beiden mittleren Zeitpunkten erhöhte oder verminderte Abundanz zeigten und sich dann wieder in Richtung ihres Ausgangswertes bewegten. Fortlaufend ansteigende Verlaufsformen zeigen 49 der differentiellen Proteinspots im 2D-DIGE-Experiment. Hierbei handelt es sich vermutlich entweder um Proteine, welche vermehrt zu den späteren Entwicklungszeitpunkten in der Bursa fabricii exprimiert sind oder aber solche, die durch eine vermehrte Anzahl an B-Zellen in den späteren Bursastadien bedingt sind. Expressionsprofile welche über die Zeit in ihrer Abundanz abnahmen konnten bei 73 Proteinen gefunden werden und könnten entweder durch speziell in der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielende Proteine bedingt sein, welche im Verlauf der weiteren Entwicklung deutlich weniger exprimiert werden, oder aber es handelt sich dabei um aus dem Stroma stammende Proteine, die durch vermehrte Einwanderung und Proliferation der B-Zellen in das Bursagewebe in den Proben der späteren Zeitpunkte weniger in Erscheinung treten. Verlaufsmuster, welche in ihrer Abundanz im Verlauf zunächst ansteigen (36 Proteine) oder abfallen (13 Proteine) und sich gegen Ende der Bursaentwicklung wieder ihrem Ausgangswert nähern sind besonders interessant, da sie sich nicht allein durch eine zu den späteren Zeitpunkten vermehrte Einwanderung von B-Zellen in die Bursa fabricii erklären lassen, sondern durch eine um den Zeitpunkt des Schlupfes deutlich vermehrte bzw. verminderte Expression des entsprechenden Proteins bedingt sein müssen.

Die anschließende Identifizierung der Spots erfolgte mit hohem zeitlichem Aufwand durch mehrere präparative Gele wodurch es gelang, 203 der 242 differentiellen, zur massenspektrometrischen Analyse vorgesehenen Spots zu identifizieren. Insgesamt wurden aus den 203 Gelspots 253 Proteine ermittelt, welche sich aus 184 eindeutig identifizierten Gelspots und 19 „Mischspots“ ergaben, in denen mehrere statistisch signifikante MS-basierte Identifizierungen erfolgt waren. Oft wird hierbei fälschlicherweise angenommen, dass das Protein mit der höchsten Abundanz das differentiell exprimierte Protein von Interesse in diesem Spot ist, was aber nicht in allen Fällen richtig ist [91]. Als einen möglichen Weg zur Lösung dieses Problems wurde daher versucht, die mittels Spectral Count ermittelten, MS-basierten quantitativen Daten zu einem Vergleich mit den Protein-Expressionsprofilen aus Decyder heranzuziehen. Dies führte zu einer nachfolgenden eindeutigeren Bestimmung von 2 der 19 Mischspots. Im Fall von Spot-Nr. 23 legten die MS-basierten Verlaufskurven die

Vermutung nahe, dass es sich bei dem für das „DeCyder“-Expressionsprofil verantwortliche Protein um Alpha-Fetoprotein handelt, sowie bei Spot Nr. 215 um das „heatshock cognate protein“.

Unter den identifizierten Proteinen fanden sich nur eine begrenzte Anzahl an Membranproteinen und keines der aus der Literatur bekannten Zytokine, welche in einen Zusammenhang mit der B-Zellentwicklung beim Huhn gebracht werden (siehe 2.2.3). Dies dürfte in der Verwendung der gelbasierten Analysemethoden und der geringen, vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze liegenden Abundanz solcher Signalproteine begründet sein, wie bereits ausführlich unter 6.3 beschrieben.

Ebenso wie die qualitativen Daten wurden auch die differentiellen Proteine der quantitativen Analyse einer genontologischen Auswertung unterzogen, bei der sich ähnliche Anteile für intrazelluläre, membranständige und extrazelluläre Proteine fanden wie bei den qualitativen Analysen. Auch hier wurden die Proteine der Klassen „Zellteilung“, „Zellwachstum“, „Zelltod“, „Zelladhäsion“, „Zellmigration“ und „Immunsystem“ näher untersucht, sowie eine Übersicht der identifizierten differentiellen Proteine erstellt, welche in Zusammenhang mit Membranen gebracht werden. Diese Klassifizierungen wurden als Kriterium bei der Auswahl der Kandidatenproteine miteinbezogen.

In den Pathway-Analysen fanden sich einige Pathways für allgemeine, allen Zellen eigene Stoffwechselvorgänge wie beispielsweise Glycolyse oder Aminosäuren-Abbau. Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit erschien der Pathway für die „Regulation des Aktin-Zytoskeletts“ besonders interessant, auf welchen unter 6.5 näher eingegangen wird.

Im Vergleich mit der publizierten Literatur fanden sich im quantitativen Datensatz einige der Proteine wieder, welche bereits in proteomischen Studien zur humanen B-Zellentwicklung [69] bzw. der Bursa Fabricii beim Haushuhn [79] (siehe 2.3.2 und 2.3.3) beschrieben wurden. Zum einen konnte in dieser Arbeit Apolipoprotein 1 als in drei Spots differentiell exprimiert ermittelt werden. Apolipoprotein ist Teil des HDL-Proteinkomplexes, welcher den Transport von Cholesterin aus Gewebe in die Leber vermittelt. Es wurde bereits in der frühen Phase der humanen B-Zellentwicklung als vermehrt exprimiert beschrieben [69] und fand sich in dieser Arbeit mit vermehrter Expression an ET10 gegenüber allen weiteren Zeitpunkten. Des Weiteren konnte als bekanntes Apoptose-Effektor-Protein Caspase 3 mit stetig steigender Abundanz über die vier Entwicklungszeitpunkte sowie die ebenfalls mit Apoptose in Zusammenhang gebrachten Proteine der Kernmembran Lamin A und Lamin B mit fallenden Expressionsprofilen über die verschiedenen Stadien identifiziert werden. Caspase 3 sowie

Lamin A und B wurden bereits durch McCarthy et. al in ihrer Analyse des bursalen Hühnerproteoms [79] beschrieben. Aus dem ebenfalls in dieser Studie beschriebenen Pathway für Proliferation und Differenzierung der B-Zellen (siehe 2.3.3) konnten das „growth factor receptor-bound protein 2“ (GRB2) und 14-3-3 mit einer erhöhten Abundanz an ET10 sowie verschiedene Formen von Aktin als differentiell reguliert nachgewiesen werden. Diese mit den bekannten Daten einhergehenden Ergebnisse zeigen, dass ein valider Ansatz zur Ermittlung entwicklungsbedingter proteomischer Veränderungen in der Bursa Fabricii des Huhns gewählt wurde.

Bei der Suche nach Kandidatenproteinen innerhalb der quantitativen Daten fiel zunächst als B-Zell-eigenes Protein MHCII ins Auge, ein membranständiges Protein, welches der Präsentation von Antigen zur Erkennung durch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen dient. Da bereits bekannt ist, dass dieses auf frühen B-Zellen nur sehr spärlich exprimiert wird und erste immunhistochemisch detektierbare Level erst nach dem Schlupf auftreten, zeigt sich das in den quantitativen Analysen erstellte Proteinexpressionsprofil mit niedrigen Abundanzwerten zu Beginn der embryonalen Entwicklung und bis zu Tag 28 ansteigender Abundanz konform mit den publizierten Daten. Dieser Zusammenhang ist im Sinne eines „proof of principle“ zu werten und ein weiterer Hinweis für die Aussagekräftigkeit der gewonnenen Daten.

#### **6.4.4. Vergleich gelbasierter und MS-basierter quantitativer Daten**

Ein Vergleich der Datensätze aus dem gelbasierten 2D-DIGE-Experiment und den MS-basierten Proteomanalysen zeigte, dass sich 192 der 253 identifizierten differentiell exprimierten Proteine bzw. 76 % der Proteine aus der DIGE-Analyse auch in den durch LC-MS/MS ermittelten Proteomen der einzelnen Entwicklungsstadien wiederfinden ließen. So konnte ca. ein Viertel aller Proteine nur durch die Verwendung von 2D-DIGE identifiziert werden, eine Tatsache, die den lohnenswerten Einsatz dieser beiden komplementären Techniken hervorhebt. Aufgrund der Überschneidungen innerhalb der identifizierten Proteine bot es sich an, den MS-basierten Datensatz zusätzlich einer quantitativen Auswertung mittels „Spectral Counting“ zu unterziehen (siehe 5.2.3). Nachdem erste visuelle Vergleiche Ähnlichkeiten zwischen den zeitlichen Verlaufskurven der „Spectral Counts“ und den Expressionsmustern des entsprechenden Proteins in der DIGE-Analyse zeigten, wurden im Folgenden die normalisierten Werte beider Analysen zueinander ins Verhältnis gesetzt (siehe 5.4.) Dabei konnten in 60,7 % der Fälle Übereinstimmungen festgestellt werden. Die Übereinstimmungen in diesem Vergleich können als Bestätigung für die richtige Identifizierung der differentiellen Spots aus der gelbasierten Proteomanalyse gewertet werden.

## 6.5. Kandidatenselektion

Bei der Suche nach interessanten Kandidaten für die Regulation der B-Zellentwicklung in der Bursa Fabricii wurden alle 253 identifizierten, differentiell exprimierten Proteine einer genaueren Untersuchung im Hinblick auf deren Proteinexpressionsprofile und Funktion unterzogen. Des Weiteren dienten zur näheren Eingrenzung der Kandidaten die erstellten genontologischen Analysen mit der Einteilung der Proteine in die Klassen „Zelladhäsion“, „Zellteilung“, „Zellwachstum“, „Zelltod“, „Zellmigration“, „Membran“ und „Immunsystem“ sowie die Zugehörigkeit zu den signifikant verstärkt betroffenen Pathways. Hierbei fanden sich unter den differentiell exprimierten, identifizierten Proteinen auffällig viele Angehörige des Aktin-Zytoskelett-Pathways. Das Aktin-Zytoskelett ist in Zellen für die mechanische Stabilisierung zur Aufrechterhaltung ihrer äußeren Form verantwortlich. Mit seinen Strukturfasern, welche ständigen Auf- und Abbau-Prozessen unterliegen, sorgt es außerdem für aktive Bewegungen der Zelle als Ganzes, sowie für intrazelluläre Bewegungen und Transporte von Zellkompartimenten. Diese Aktin-Strukturen innerhalb der Zelle stehen über so genannte fokale Adhäsionsproteine mit membranären Adhäsionsproteinen, den so genannten Integrinen in Verbindung, welche den Kontakt der Zelle zur äußeren Umgebung in Form von Zell-Zell-Interaktionen oder Verbindungen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix vermitteln [120]. Die Tatsache, dass diese Gruppe von Proteinen während der Phasen der Bursaentwicklung vermehrt in ihrer Expression reguliert zu sein scheint, deutet auf eine vermehrte Migrationsrate einzelner Zellen zwischen den einzelnen Entwicklungsphasen hin. Dies steht im Einklang mit den bekannten Phasen der B-Zellentwicklung, während derer die B-Zellen zwei große Migrationswellen durchlaufen, zum einen eine Einwanderungswelle in die Bursa Fabricii während der frühen Phase der Embryonalentwicklung und zum anderen eine gegenläufige Emigrationsbewegung gegen Ende der embryonalen Phase. Diese Wanderungsbewegungen erfordern sehr wahrscheinlich eine erhöhte Aktivität des Aktin-Zytoskeletts der B-Zellen.

Innerhalb der Proteine des Aktin-Zytoskelett-Pathways fielen in dieser Arbeit sowohl Vinculin als auch Gelsolin durch ihre charakteristischen Expressionsmuster und die genontologischen Analysen auf. Im Folgenden soll daher näher auf diese beiden Kandidatenproteine eingegangen werden.

### 6.5.1. Vinculin

Vinculin ist ein 125 kDa schweres Protein mit einer Länge von 1135 Aminosäuren und wurde beim Huhn bereits auf Proteinebene detektiert. In den quantitativen Proteinanalysen der Bursa

Fabricii war Vinculin über die vier verschiedenen Entwicklungszeitpunkte hinweg signifikant differentiell exprimiert. Dabei zeigte das Protein zu Beginn der embryonalen Entwicklung erhöhte Abundanzwerte, welche nach ET18 steil abfielen. Vinculin konnte in den genontologischen Analysen den Gruppen „Zelladhäsion“, „Zellmigration“ und „Membranprotein“ zugeordnet werden.

Vielfältige zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Migration, Differenzierung und Zelltod werden durch Signale, welche aus der direkten Zellumgebung kommen, gesteuert. Dabei haben Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsionen Einfluß auf die Struktur des Zell-Zytoskeletts und die damit zusammenhängenden zellulären mechanische Eigenschaften [121]. Als fokales Adhäsionsprotein koppelt Vinculin die extrazelluläre Matrix durch Integrine an das Aktin-Zytoskelett und ist als Schlüsselprotein in der Regulation der Übertragung von kontraktile Kräften ein wichtiger regulatorischer Faktor zellulärer mechanischer Funktionen [122]. Das dem Hühnerprotein zu 93 % identische Homolog des Menschen gliedert sich in eine vier Domänen lange Kopfregion sowie eine aus einer Domäne bestehende Schwanzregion, welche miteinander über eine flexible Hingeregion in Verbindung stehen [123]. Mit seiner Kopfregion bindet Vinculin über die Verbindungsproteine Talin oder Paxillin an Integrine in der Zellmembran, mit seiner Schwanzregion an Aktinfilamente des Zell-Zytoskeletts. Es konnte gezeigt werden, dass Vinculin in Zusammenhang mit der Motilität von Zellen steht und die Menge an vorhandenem Vinculin mit der Wanderungsgeschwindigkeit von Zellen korreliert [124]. Für Zellen ist die Expression von Vinculin essentiell, um den viskösen Widerstand der Umgebung zu überwinden und sich vorwärts bewegen zu können [122]. So ist in Anwesenheit von Vinculin die Generierung von kontraktile Kräften innerhalb der Zelle gegenüber Vinculin-negativen Zellen um bis zu siebenfach verstärkt [125],[122]. Diese kontraktile Kräfte sind die Voraussetzung für die Zellinvasion in eine dichte dreidimensionale extrazelluläre Matrix [122],[126].

Die differentielle Expression von Vinculin über die vier verschiedenen Entwicklungszeitpunkte hinweg mit einer hohen Abundanz zu Beginn der embryonalen Entwicklung und nach ET18 steil abfallenden Expressionsleveln könnte auf eine Beteiligung von Vinculin an der Migration der B-Vorläuferzellen in das Bursagewebe hindeuten. Möglicherweise wird in dieser frühen Phase der embryonalen Entwicklung eine vermehrte Vinculin-Expression in den B-Zellen benötigt, um deren kontraktile Kräfte zu erhöhen und so die Einwanderung in die dichte dreidimensionale Matrix des Bursagewebes zu ermöglichen. Als alternative Hypothese wäre denkbar, dass die erhöhten Vinculin-Expressionsleveln an ET10 und ET18 sich durch eine erhöhte Gesamt-Zellmotilität aufgrund der embryonalen

Gewebisdifferenzierung der Bursa Fabricii bedingen. Zu den späteren Entwicklungszeitpunkten, welche die Situation im fertig ausdifferenzierten Organ widerspiegeln, finden sich dann vergleichsweise geringe Level an Vinculin. Für einen Hinweis in die eine oder andere Richtung bieten sich nachfolgende immunhistologische Untersuchungen zur Lokalisation der Vinculin-Expression an, welche Aufschluss darüber geben können, ob Vinculin ausschließlich auf den frühen B-Zellen oder im gesamten Gewebe exprimiert wird.

### **6.5.2. Gelsolin**

Gelsolin ist ein 86 kDa schweres, 778 Aminosäuren langes Protein, welches im Hühnergenom bisher nur auf Transkriptebene beschrieben ist und dessen Aminosäuresequenz zu ca. 80 % mit humanem Gelsolin übereinstimmt. Beim Menschen sind auf Proteinebene mittlerweile drei Gelsolin-Isoformen beschrieben, welche durch Splice-Varianten desselben Gens entstehen. Zwei der Isoformen sind zytosolische Proteine und eines eine sezernierte Form, welche im Plasma vorkommt [127-128]. In dieser Arbeit war es durch die Verwendung der 2D-DIGE-Technologie möglich, im Huhn ebenfalls drei unterschiedliche Ladungs-Isoformen von Gelsolin zu detektieren, welche ihren isoelektrischen Punkt in einem Bereich von ca. pH 6,2 – pH 6,4 hatten. In den quantitativen Proteomanalysen der Bursa zeigten sich erhöhte Gelsolin-Expressionslevel an ET18 sowie bei zwei der Isoformen zusätzlich an ET10. An Tag 2 nach dem Schlupf zeigten alle drei Isoformen mittlere Abundanzen und an Tag 28 die niedrigsten Expressionswerte. Gelsolin konnte auch im qualitativen Proteom der aufgereinigten B-Zellen nachgewiesen werden.

Genontologische Untersuchungen bringen Gelsolin in Zusammenhang mit der Regulation von Zelladhäsion durch Aktinfilament-Auf- und Abbau, Zellmotilität, sowie in Verbindung mit Apoptose. Das humane Protein besteht aus sechs sich wiederholenden, so genannten „Gelsolin-like“ oder G-Domänen und ist in der Lage Aktinfilamente zu binden, voneinander abzutrennen und diese gleichzeitig zu „cappen“, d.h. deren freies Ende zu besetzen [129]. Gelsolin liegt normalerweise in einer inaktiven globulären Form vor und wird unter Calciumeinfluß sowie bei niedrigen pH-Werten durch eine Konformationsänderung seiner 3D-Struktur aktiviert [130-131]. Nach erfolgreicher Aktivierung ist Gelsolin in der Lage Aktinfilamente zu binden, diese zu spalten und deren Enden zu besetzen und verhindert dadurch deren Polymerisation. Die Abspaltung des durch Gelsolin besetzten Endes geschieht unter Einfluss von Phosphatidylinositol. Die durch die Spaltung frei gewordenen Aktinfilamentenden können nachfolgend polymerisieren [132]. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung zeigt sich in der Spaltung von Gelsolin durch den bekannten Apoptosemediator Caspase 3, für welchen Gelsolin eines seiner Substrate darstellt [133]. Caspase 3 spaltet

Gelsolin in zwei Teile, von denen der kleinere Anteil die nachfolgende Spaltung der Aktinfilamente vermittelt, ein Prozess, welcher schlussendlich in die Apoptose der betreffenden Zelle mündet [134]. Auch die Caspase 3 fand sich in diesem Datensatz als differentiell exprimiertes Protein mit niedrigen Expressionswerten an ET10, welche dann über ET18 ansteigen und an Tag 2 und Tag 28 nach dem Schlupf die höchsten Abundanzwerte erreichen.

Während die Apoptoseraten der B-Zellen in der Bursa Fabricii während der Embryonalentwicklung relativ gering sind, steigen diese kurz nach dem Schlupf steil an. Dazu passen die in dieser Arbeit detektierten erhöhten Expressionslevel von Gelsolin kurz vor dem Schlupf an ET18 sowie die erhöhten Abundanzwerte der Caspase 3 kurz nach dem Schlupf an Tag 2. Gelsolin könnte also in Zusammenhang mit dem übergeordneten Apoptosemediator Caspase 3 ein wichtiges Effektorprotein in der Apoptose der bursalen B-Zellen ohne produktive Immunglobulin-Rezeptor-Diversifizierung sein. Diese gehen beginnend um den Zeitpunkt des Schlupfes zu Grunde, während die B-Zellen mit einem funktionsfähigen Immunglobulin-Rezeptor in die Peripherie auswandern.

Neben seiner Funktion in der Apoptose von Zellen wurde Gelsolin auch in Zusammenhang mit Zellmotilität beschrieben. So zeigte sich beispielsweise in Überexpressionsstudien mit Gelsolin in Fibroblasten, dass diese Zellen eine erhöhte Motilität aufwiesen [135]. In einer *in vivo*-Studie mit Gelsolin-Knockout-Mäusen waren Osteoklasten nicht in der Lage Zelladhäsionsstrukturen wie Lamellipodien auszubilden und wiesen eine reduzierte Zellmotilität auf [136]. Weiterhin zeigte sich eine Beteiligung von Gelsolin bei der Ausbildung von neuronalen Wachstumskernen [137]. Es ist denkbar, dass Gelsolin auch zu einer erhöhten Motilität der präbursalen B-Zellen in der frühen Embryonalentwicklung im Huhn beiträgt. Die in dieser Studie gefundenen, erhöhten Gelsolin-Expressionswerte an ET10 bei zwei der Isoformen, zusätzlich zu der erhöhten Abundanz aller Gelsolin-Isoformen an ET18, könnten daher Hinweis auf eine Beteiligung des Proteins an der Migration der frühen B-Zellen in die Bursa-Anlage zwischen ET8 und ET14 sein.

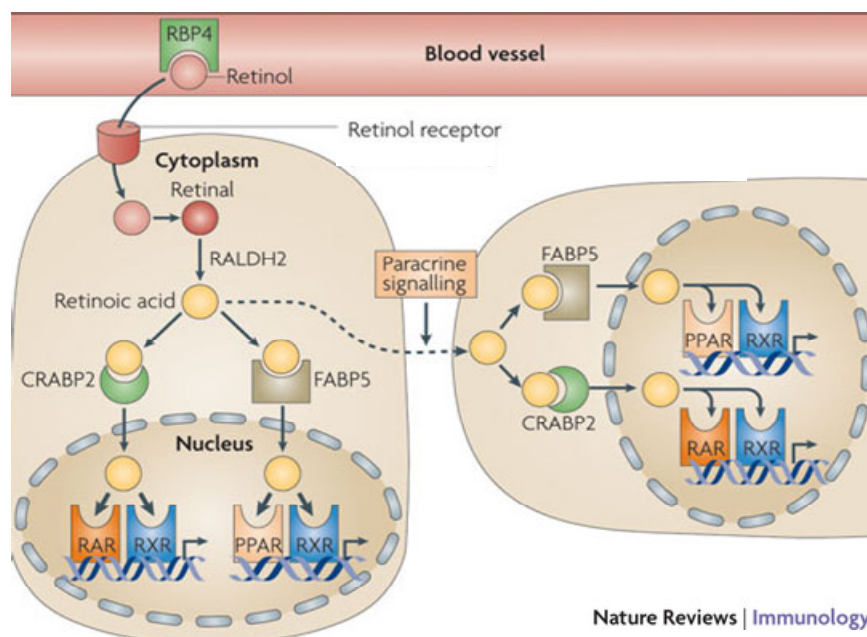
Um weitere Hinweise auf die Funktion von Gelsolin in der bursalen B-Zellentwicklung zu erhalten, sind Überexpressionsstudien mit diesem Protein, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, sowie funktionelle Knockdowns von Gelsolin mittels siRNA denkbar.

### 6.5.3. Proteine des Retinolsäure-Metabolismus

In den quantitativen Proteomanalysen der bursalen Stadien wurden mehrere Proteine des Retinolsäure-Metabolismus als differentiell exprimiert identifiziert. Eines dieser Proteine war die Retinaldehydrogenase 2 (ALDH1A2), ein 518 Aminosäuren langes und 57 kDa schweres Protein, welches beim Huhn bisher noch nicht auf Proteinebene detektiert wurde. Die Retinaldehydrogenase zeigt in den quantitativen Proteomanalysen die höchsten Expressionslevel an ET10, fällt über ET18 langsam ab und erreicht die niedrigsten Abundanzwerte an Tag 2 nach dem Schlupf. An Tag 28 steigt die Abundanz erneut auf mittlere Werte, vergleichbar zu ET18.

Retinolsäure spielt eine Rolle in vielen essentiellen biologischen Pathways wie beispielsweise in der embryonalen Entwicklung der Körperachse oder des Nervensystems [138], sowie in verschiedenen immunologischen Prozessen [139]. Sie wird aus Retinol oder Vitamin A metabolisiert, welches mit der Nahrung aufgenommen und in der Leber gespeichert wird. Dort geht Retinol einen Komplex mit dem „retinol-binding protein 4“ (RBP-4) ein, der für dessen Transport über das Blut benötigt wird [140] (siehe Abb. 32).

**Abb. 32 Autokrine und parakrine Wirkung von Retinolsäure (nach Van de Pavert und Mebius [140])**



Nach Bindung des Retinol-RBP-4-Komplexes an spezielle membranständige Rezeptoren erfolgt die Retinol-Aufnahme in die Zelle und die Umwandlung in Retinal. Durch die Enzyme Retinaldehydrogenase 1 (RALDH1), auch bekannt unter dem Namen ALDH1A1, RALDH2 (ALDH1A2) und RALDH3 (ALDH1A3) wird Retinol irreversibel zu Retinolsäure metabolisiert, wobei ALDH1A2 während der embryonalen Entwicklung die größte



Bedeutung zukommt [138]. Daran anschließend wird sie entweder autokrin verwendet oder im Sinne einer parakrinen Funktion sezerniert [138]. Innerhalb der Zelle bindet Retinolsäure verschiedene Proteine, darunter das „cellular retinoic acid-binding protein 2“ (CRABP2), welches die Retinolsäure zu DNA-bindenden Retinolsäure-Rezeptoren (RAR) im Zellkern transportiert. Ein anderes Transportprotein, „fatty acid-binding protein 5“ (FABP5) transportiert Retinolsäure zu ebenfalls an der nukleären DNA lokalisierten „peroxisome proliferator activated receptors“ (PPAR), welche im Falle der Bindung an PPAR- $\beta$  zu einem Stillstand des Zellzyklus und bei Bindung an PPAR- $\delta$  zur Proliferation der Zelle führen [141].

Im Säuger werden die Enzyme der RALDH-Gruppe in Epithelzellen und der Lamina propria des Darms von Dünndarm und Kolon [139, 142] sowie in Mesenteriallymphknoten und Peyer'schen Platten von dendritischen Zellen und Stromazellen exprimiert. Die in Folge dessen von diesen Zellen sezernierte Retinolsäure wirkt in parakriner Weise auf das Homing, die Differenzierung und Proliferation von B-Zellen in diesen Strukturen [139, 143] und spielt somit eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung der sekundären Lymphgewebe. Erste Zellen der hämatopoetische Reihe werden durch die Chemokin-Expression von Stromazellen zum Ort der Lymphknotenentwicklung gelockt. Hierbei erwies sich die Retinolsäure als essentiell für die Expression des Chemokins CXCL13 durch die Stromazellen [144]. Noch vor diesem Schritt spielen Signale für die Induzierung dieser Chemokinexpression, welche aus Neuronen stammen, eine Rolle. Diese Signale, welche eine Rolle in der Entwicklung der intestinalen Nervensystems spielen, scheinen auch an der Ausbildung der Peyer'schen Platten beteiligt zu sein [145]. Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass von Motoneuronen produzierte Retinolsäure die Lokalisation der Ausbildung von Lymphgewebe während der embryonalen Entwicklung bestimmt [146-148]. Es konnte gezeigt werden, dass Nervenfasern, welche sich in der Nähe von entwickelnden Lymphknoten befinden, RALDH2 exprimieren und so durch die Generierung von Retinolsäure für die Induktion der CXCL13-Expression von Stromazellen verantwortlich sein könnten [144].

Die in dieser Arbeit ermittelten hohen Expressionslevel der ALDH1A2 an ET10 geben Anlass zu der Vermutung, dass das Vorhandensein von Retinolsäure innerhalb der bursalen Embryonalentwicklung einem ähnlichen Muster folgt, da die vermehrte Expression des Enzyms vermutlich zu einer erhöhten Umwandlungsrate von Retinol in Retinolsäure führt. Dies könnte im Hinblick auf die publizierten Daten über die Rolle der Retinolsäure in der Entwicklung von Lymphgewebe beim Säuger auch auf eine Beteiligung dieses Proteins an der aviären Bursaentwicklung hindeuten. Es ist denkbar, dass auch hier das Vorhandensein von

Retinolsäure in Lymphgewebe die Expression bestimmter Chemokine initiiert. Die hohen ALDH1A2-Expressionslevel an ET10 könnten so evtl. mit der Einwanderung der B-Zellen in die Bursa um diesen Zeitpunkt durch noch nicht näher charakterisierte Chemokinexpression bursaler Stromazellen in Verbindung stehen.

Einen weiteren Hinweis auf eine möglicherweise entscheidende Bedeutung von Retinolsäure in der embryonalen Bursaentwicklung gibt auch die differentielle Expression dreier weiterer, in Zusammenhang mit dem Retinolsäure-Metabolismus stehender Proteine. So konnte neben ALDH1A2 auch das „retinol-binding protein 5“ (RBP5) mit hohen Expressionsleveln an ET10 identifiziert werden. Dieses 16 kDa schwere und 135 Aminosäuren lange Protein, welches bisher ebenfalls noch nicht auf Proteinebene im Huhn detektiert wurde, ist für den intrazellulären Transport von Retinol verantwortlich und gehört zu der Familie der „fatty acid binding proteins“ (FABP) oder Fettsäure-bindenden Proteine. Ein weiterer Vertreter dieser Familie konnte mit FABP7 identifiziert werden. Dieses 15 kDa schwere, 132 Aminosäuren lange Protein, welches bisher für die Expression in radialen Gliafasern in der Gehirnentwicklung bekannt ist, wies ebenfalls erhöhte Abundanz der Proteinexpression an ET10 auf. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Ausbildung eines Systems an radialen Gliafasern während der Ontogenese des ZNS essentiell für die Migration von Neuronen ist, welche der Ausbildung von kortikalen Schichten entlang dieser Fasern dienen. Mit neueren Erkenntnissen, die auf eine vermehrte Beteiligung von Fasern des Nervensystems an der Ausbildung von Lymphgewebe hindeuten, könnte FABP7 auch für die Migration von B-Zellen entlang solcher Fasern in die noch unreife Bursa während der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen. Ein weiteres Transportprotein für Retinol, welches ebenfalls hohe Expressionslevel an ET10 zeigte, konnte mit Transthyretin (TTR) identifiziert werden. Dieses 15 kDa schwere Protein mit einer Länge von 150 Aminosäuren ist als einziger der in dieser Arbeit gefundenen Vertreter der mit Retinolsäure in Zusammenhang stehenden Moleküle bereits im Huhn auf Proteinebene beschrieben und ist für den Transport von Retinol in Serum und Zerebrospinalflüssigkeit verantwortlich.

Alle in dieser Arbeit detektierten, in Zusammenhang mit dem Retinolsäure-Metabolismus stehenden Proteine folgen ähnlichen Proteinexpressionsmustern mit den höchsten Abundanzwerten an ET10, welche nachfolgend abfallen. Dies führt zu der Hypothese, dass die embryonale Entwicklung der Bursa Fabricii von ähnlichen Faktoren gesteuert sein könnte wie die embryonale Ausbildung der sekundär-lymphatischen Organe beim Säuger, bei der Retinolsäure-abhängige Proteine wie die ALDH1A2 oder CXCL13 eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Diese Annahme scheinen auch die in der parallelen Transkriptomstudie

zur Bursaentwicklung (Schmieder, S., „Transkriptomische Analyse der Bursa Fabricii des Huhns zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten“) generierten Daten über die differentielle mRNA-Expression dreier Isoformen von chCXCL13 innerhalb der Embryonalentwicklung zu unterstützen. Zur weiteren Abklärung dieser Hypothese bieten sich auch hier Überexpressionsstudien sowie funktionelle Knockdowns der Retinaldehydrogenase mittels retroviraler Gentransfersysteme bzw. siRNA an.

## **6.6. Ausblick**

Zur Bestätigung der Gewebsexpression der differentiell exprimierten Kandidatenproteine sind immunhistochemische Analysen auf histologischen Bursagewebspräparaten geplant. Des Weiteren sollen die Kandidaten in folgenden *in vitro*-Analysen sowie *in vivo*-Studien näher charakterisiert werden. Darunter fallen Überexpressionstudien der einzelnen Kandidaten, welche aufgrund der noch nicht sehr weit fortgeschrittenen Transgentechnologie beim Huhn durch retrovirale Gentransfersysteme erfolgen sollen. Für funktionelle Knockdowns der entsprechenden Kandidatengene könnte das so genannte „Gene Silencing“ genutzt werden, eine Technik welche die Translation bestimmter Proteine auf posttranskriptionaler Ebene mittels siRNA verhindert.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, molekulare Vorgänge während der B-Zellentwicklung in der Bursa Fabricii des Haushuhns mittels proteomischer Analysen zu charakterisieren. Hierfür wurden zunächst repräsentative Zeitpunkte der bursalen B-Zellentwicklung für die Probengewinnung definiert. Daran schlossen sich qualitative Proteomanalysen der Bursa Fabricii zu den gewählten Entwicklungszeitpunkten Embryonaltag 10 (ET10), Embryonaltag 18 (ET18), Tag 2 und Tag 28 nach dem Schlupf an. Diese erfolgten durch Vorfraktionierung der Proben mittels 1D-SDS-PAGE und nano-HPLC gefolgt von Tandem-MS-Analysen. Hierbei konnten für die bursalen Proteome zu jedem Zeitpunkt zwischen 1152 und 1392 Proteine identifiziert werden ( $\text{FDR} < 1\%$ ). Überschneidungen der einzelnen Zeitpunkte in 537 allgemeinen Struktur- und Stoffwechsel-Proteinen berücksichtigt, wurden insgesamt 2214 verschiedene Proteine identifiziert. Eine zusätzliche qualitative Analyse aufgereinigter bursaler B-Zellen führte zur Identifizierung von 758 Proteinen. Durch genontologische Analysen konnte festgestellt werden, dass für das Zellwachstum verantwortliche Proteine v.a. zu den frühen Zeitpunkten zu finden waren, während Proteine, welche eine Rolle für das Immunsystem spielen, eher zu späteren Entwicklungszeitpunkten in Erscheinung traten. Dies spiegelt die Entwicklung der Bursa von der unreifen, embryonalen Wachstums- und Differenzierungsprozessen unterliegenden Bursaanlage, zum fertig ausdifferenzierten, primär-lymphatischen Organ auf molekularer Ebene wider. Konform zu den hohen Proliferationsraten der B-Zellen während der Bursaentwicklung fanden sich in den genontologischen Analysen der B-Zellen besonders hohe Anteile an Proteinen, welche für Zellteilung verantwortlich sind. Proteine, welche in Zusammenhang mit Zellmigration stehen, wurden vor allem in der B-Zell-Probe sowie an ET10 gefunden, was als Hinweis auf eine Beteiligung dieser Proteine an der Einwanderung der B-Zellen in die Bursaanlage betrachtet werden kann.

Die anschließende quantitative Proteomanalyse wurde zu denselben Entwicklungszeitpunkten an je sechs biologischen Replikaten mittels 2D-DIGE durchgeführt. In der statistischen Auswertung der quantitativen Veränderungen zeigten sich 402 hochsignifikante Unterschiede zwischen den bursalen Proteomen der verschiedenen Entwicklungszeitpunkte, wobei die sehr große Übereinstimmung der Analyseergebnisse innerhalb der biologischen Replikate die gute Reproduzierbarkeit der Experimente belegte. Die deutlichsten Veränderungen zeigten sich zwischen ET10 und allen weiteren Zeitpunkten, wohingegen innerhalb der übrigen Stadien eine geringere Anzahl signifikanter Unterschiede nachgewiesen wurde. Für die 402

differentiell exprimierten Proteine konnten verschiedene charakteristische Protein-expressionsverläufe nachgewiesen werden, welche Rückschlüsse auf die biologischen Hintergründe ermöglichten. Durch massenspektrometrische Analysen der Proteine mittels MALDI-TOF/TOF und LC-MS/MS gelang es, 203 der 242 zur Identifikation vorgesehenen Spots zu identifizieren.

Im Rahmen einer bioinformatischen Auswertung des erhaltenen Datensatzes erbrachten sowohl die genontologische Analysen als auch Pathway-Analysen wesentliche Anhaltspunkte für die Auswahl besonders interessanter und vielversprechender Proteine für weiterführende funktionelle Analysen. Unter den identifizierten, differentiell exprimierten Proteinen fanden sich auffällig viele Vertreter des Aktin-Zytoskelett-Pathways, welcher für die mechanische Stabilisierung von Zellen und deren aktive Bewegungen verantwortlich ist. Dabei fielen in dieser Arbeit sowohl Vinculin als auch Gelsolin durch ihre charakteristischen Expressionsmuster auf. Vinculin zeigte zu Beginn der embryonalen Entwicklung erhöhte Abundanzwerte, welche nach ET18 steil abfielen. Als fokales Adhäsionsprotein stellt es ein Schlüsselprotein in der Regulation der Übertragung von kontraktilen Kräften dar, welche die Voraussetzung für die Migration von Zellen sind. Gelsolin, ein wichtiges Apoptose-Effektorprotein, welches auch in Verbindung mit Zellmotilität gebracht wird, zeigte erhöhte Expressionslevel an ET18, welche über die nachfolgenden Entwicklungszeitpunkte abfielen. Gelsolin konnte in drei verschiedenen Ladungs-Isoformen detektiert werden.

Für die Fragestellung dieser Arbeit interessant erschien weiterhin eine Gruppe differentiell exprimierter Proteine des Retinolsäure-Metabolismus. Im Einzelnen wurden die Retinaldehydrogenase 2 (ALDH1A2), das „retinol-binding protein 5“ (RBP5), das „fatty acid-binding protein 7“ (FABP7), und Transthyretin (TTR) mit ähnlichen Proteinexpressionsprofilen detektiert, welche ihr Expressionsmaximum jeweils an ET10 aufwiesen. Das könnte ein Hinweis sein, dass die embryonale Entwicklung der Bursa Fabricii von ähnlichen Faktoren gesteuert ist wie die embryonale Ausbildung der sekundär-lymphatischen Organe beim Säuger, bei der Retinolsäure-abhängige Proteine eine entscheidende Rolle spielen.

Über die Thematik dieser Arbeit hinausgehend, stellt der umfangreiche proteomische Datensatz dieser Arbeit eine wertvolle Ressource dar, die sowohl für weitere Fragestellungen bezüglich der Bursa Fabricii des Huhns, als auch für die Vervollständigung der Annotation des Hühnergenoms genutzt werden können.

## 8. SUMMARY

### **Differential proteome analysis of the chicken Bursa of Fabricius at relevant developmental stages**

The aim of this study was to characterize molecular changes during B-cell development in the chicken Bursa of Fabricius applying proteomic techniques. First, samples were taken at four representative stages of B-cell differentiation, which was embryonic day 10 (ED10), embryonic day 18 (ED18), day 2 and day 28 after hatch and subjected to qualitative proteome analysis. Using 1D-SDS-PAGE followed by nano-HPLC for separation, tandem mass spectrometry led to the identification of 1152 to 1392 proteins for each of the four stages and 2214 proteins in total. These included 537 proteins which were found in all samples, containing mostly proteins essential for cell structure and metabolism. In addition, we performed a qualitative proteome analysis of purified bursa-derived B-cells, which led to the identification of 758 proteins. Gene ontology analyses revealed proteins related to cell growth being more prominent at early developmental stages, while immune related proteins were preferentially identified at later stages, hence reflecting bursal development from an immature developing bursa anlage to the fully developed, primary lymphatic organ. Consistent with high proliferation rates of the B-cells during bursal development, many proteins related to cell division were found in the bursal B-cell proteome. Proteins linked to cell migration were primarily found in the B-cell lysate, as well as in bursa lysate from ED 10. This suggests that these proteins may participate in the immigration of B-cells into the bursa anlage.

Subsequent quantitative proteome analyses for the same developmental stages were performed using 2D-DIGE on six biological replicates for each stage. Statistical analysis revealed 402 differentially abundant proteins between the bursal proteomes of the four stages, while highly similar results for all biological replicates confirmed the high reproducibility for the differences between all stages. The most significant changes were detected between the bursal proteome of ED10 and the following stages, while all other stages showed fewer but also distinct changes. These protein spots were assigned to several characteristic courses of expression profiles, facilitating correlation to the underlying biological processes. Using MALDI-TOF/TOF analysis, 203 out of 242 prominent spots could be identified.

Bioinformatic evaluation of the data set, comprising gene ontology as well as pathway analyses, revealed promising candidate proteins for further functional characterization. Interestingly, a noticeably large amount of differentially abundant proteins was associated with

the pathway for regulation of the actin cytoskeleton, which is known to be involved in mechanical stabilization of cells and their active movements. In particular vinculin as well as gelsolin were noticed due to their characteristic expression profiles. Vinculin showed high expression levels at early embryonic development, which declined rapidly after ED18. As a focal adhesion protein, vinculin is a key regulator in the transmission of contractile forces, which are required for cell migration. Gelsolin is a known effector protein in apoptosis and is also related to cell motility. It showed increased expression levels on ED18, which gradually declined afterwards. Three differently charged isoforms of Gelsolin could be detected.

Another group of highly interesting differentially expressed proteins is linked to retinoic acid metabolism: retinal dehydrogenase 2 (ALDH1A2), retinol-binding protein 5 (RBP5), fatty acid-binding protein 7 (FABP7) and transthyretin (TTR) were detected with similar expression profiles, showing highest levels on ED10. Thus, the embryonic development of the Bursa of Fabricius might be controlled by similar factors as embryonic development of secondary lymphatic tissues in mammals, in which retinoic acid dependent proteins play an important role.

In addition to the identification of proteins relevant for this project, the comprehensive data set derived from this extensive study provides a valuable resource, with substantial benefits for future projects regarding the development of the chicken Bursa of Fabricius as well as for the completion of the ongoing chicken genome annotation.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Glick, B., *The ontogeny and microenvironment of the avian thymus and bursa of Fabricius: contribution of specialized cells to the avian immune response*. Adv Vet Sci Comp Med, 1985. **30**: p. 67-90.
2. Namikawa, R., et al., *Ontogenic development of T and B cells and non-lymphoid cells in the white pulp of human spleen*. Immunology, 1986. **57**(1): p. 61-9.
3. Olah, I., et al., *Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ*. Poult Sci, 2003. **82**(5): p. 767-70.
4. Burns, R.B., *Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (Gallus domesticus)*. Res Vet Sci, 1982. **32**(3): p. 359-67.
5. Olah, I., B. Glick, and R.L. Taylor, Jr., *Meckel's diverticulum. II. A novel lymphoepithelial organ in the chicken*. Anat Rec, 1984. **208**(2): p. 253-63.
6. Ratcliffe, M.J., *B cell development in gut associated lymphoid tissues*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **87**(3-4): p. 337-40.
7. Moyron-Quiroz, J.E., et al., *Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 927-34.
8. Fix, A.S. and L.H. Arp, *Morphologic characterization of conjunctiva-associated lymphoid tissue in chickens*. Am J Vet Res, 1991. **52**(11): p. 1852-9.
9. Mansikka, A., et al., *B cell maturation in the chicken Harderian gland*. J Immunol, 1989. **142**(6): p. 1826-33.
10. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *B cell development pathways*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 595-621.
11. Fanning, L.J., A.M. Connor, and G.E. Wu, *Development of the immunoglobulin repertoire*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **79**(1): p. 1-14.
12. Ratcliffe, M.J. and K.A. Jacobsen, *Rearrangement of immunoglobulin genes in chicken B cell development*. Semin Immunol, 1994. **6**(3): p. 175-84.
13. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
14. Meyer, A., et al., *Immunoglobulin gene diversification in cattle*. Int Rev Immunol, 1997. **15**(3-4): p. 165-83.
15. Parng, C.L., et al., *Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5478-86.



16. Reynaud, C.A., et al., *Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches*. Cell, 1991. **64**(5): p. 995-1005.
17. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 119-30.
18. Weinstein, P.D., A.O. Anderson, and R.G. Mage, *Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 647-59.
19. Weinstein, P.D., R.G. Mage, and A.O. Anderson, *The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit*. Adv Exp Med Biol, 1994. **355**: p. 249-53.
20. Moore, M.A. and J.J. Owen, *Experimental studies on the development of the bursa of Fabricius*. Dev Biol, 1966. **14**(1): p. 40-51.
21. Davison, F., Schat, K.A. and Kaspers, B., *Avian Immunology*. 2008: Elsevier Ltd.
22. Bockman, D.E. and M.D. Cooper, *Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study*. Am J Anat, 1973. **136**(4): p. 455-77.
23. Olah, I. and B. Glick, *The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius*. Poult Sci, 1978. **57**(5): p. 1445-50.
24. Glick, B., *The bursa of Fabricius: the evolution of a discovery*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 979-83.
25. Ratcliffe, M.J., *The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius*. Immunology Today, 1985. **6**(7): p. 223-27.
26. Toivanen, P. and A. Toivanen, *Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics*. Eur J Immunol, 1973. **3**(9): p. 585-95.
27. Houssaint, E., M. Belo, and N.M. Le Douarin, *Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras*. Dev Biol, 1976. **53**(2): p. 250-64.
28. Ratcliffe, M.J., et al., *Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event*. Eur J Immunol, 1986. **16**(2): p. 129-33.
29. Grant, J.A., B. Sanders, and L. Hood, *Partial amino acid sequences of chicken and turkey immunoglobulin light chains. Homology with mammalian lambda chains*. Biochemistry, 1971. **10**(16): p. 3123-32.
30. Janeway, C., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Fourth Edition

- ed. 1999: Current Biology Publications / Garland Publishing.
31. Masteller, E.L. and C.B. Thompson, *B cell development in the chicken*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 998-1011.
  32. Weigert, M., et al., *The joining of V and J gene segments creates antibody diversity*. Nature, 1980. **283**(5746): p. 497-9.
  33. Reynaud, C.A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. Cell, 1985. **40**(2): p. 283-91.
  34. Le Douarin, N.M., et al., *Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(7): p. 2701-5.
  35. Varki, A., *Selectin ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(16): p. 7390-7.
  36. Masteller, E.L., et al., *Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis*. Development, 1995. **121**(6): p. 1657-67.
  37. Houssaint, E., A. Torano, and J. Ivanyi, *Ontogenic restriction of colonization of the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1983. **13**(7): p. 590-5.
  38. McCormack, W.T., et al., *Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development*. Genes Dev, 1989. **3**(6): p. 838-47.
  39. Ratcliffe, M.J. and L. Tkalec, *Cross-linking of the surface immunoglobulin on lymphocytes from the bursa of Fabricius results in second messenger generation*. Eur J Immunol, 1990. **20**(5): p. 1073-8.
  40. Sayegh, C.E., M.A. Rao, and M.J. Ratcliffe, *Avian B cell development: lessons from transgenic models*. Vet Immunol Immunopathol, 1999. **72**(1-2): p. 31-7.
  41. Sayegh, C.E., et al., *The chicken B-cell receptor complex and its role in avian B-cell development*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 187-200.
  42. Otsubo, Y., et al., *Role of bursin in the development of B lymphocytes in chicken embryonic Bursa of Fabricius*. Dev Comp Immunol, 2001. **25**(5-6): p. 485-93.
  43. McCormack, W.T., L.W. Tjoelker, and C.B. Thompson, *Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 219-41.
  44. McCormack, W.T. and C.B. Thompson, *Chicken IgL variable region gene conversions display pseudogene donor preference and 5' to 3' polarity*. Genes Dev, 1990. **4**(4): p. 548-58.

45. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-8.
46. Paramithiotis, E., K.A. Jacobsen, and M.J. Ratcliffe, *Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 105-13.
47. Sayegh, C.E. and M.J. Ratcliffe, *Perinatal deletion of B cells expressing surface Ig molecules that lack V(D)J-encoded determinants in the bursa of Fabricius is not due to intrafollicular competition*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5041-8.
48. Lampisuo, M., et al., *Expression of chL12 surface antigen is associated with cell survival in the avian bursa of Fabricius*. Scand J Immunol, 1998. **47**(3): p. 223-8.
49. Jacobsen, K.A., et al., *Apoptotic cell death in the chicken bursa of Fabricius*. Adv Exp Med Biol, 1996. **406**: p. 155-65.
50. Schneider, K., et al., *Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*. Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 139-48.
51. Kothlow, S., et al., *Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken*. Int Immunol, 2007. **19**(2): p. 203-15.
52. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 96-102.
53. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *B cell emigration directly from the cortex of lymphoid follicles in the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1994. **24**(2): p. 458-63.
54. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(2): p. 159-66.
55. Arakawa, H., et al., *Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers*. Embo J, 1996. **15**(10): p. 2540-6.
56. MacLennan, I.C. and D. Gray, *Antigen-driven selection of virgin and memory B cells*. Immunol Rev, 1986. **91**: p. 61-85.
57. Leslie, G.A. and L.W. Clem, *Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken*. J Exp Med, 1969. **130**(6): p. 1337-52.
58. Warr, G.W., K.E. Magor, and D.A. Higgins, *IgY: clues to the origins of modern antibodies*. Immunol Today, 1995. **16**(8): p. 392-8.
59. Armitage, R.J., *Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(3): p. 407-13.

60. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
61. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.
62. Schneider, P., *The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 282-9.
63. van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 2-17.
64. Kaiser, P., et al., *A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(8): p. 467-84.
65. Burgess, S.C., *Proteomics in the chicken: tools for understanding immune responses to avian diseases*. Poult Sci, 2004. **83**(4): p. 552-73.
66. Vuadens, F., et al., *Identification of specific proteins in different lymphocyte populations by proteomic tools*. Proteomics, 2002. **2**(1): p. 105-11.
67. Frey, J.R., M. Fountoulakis, and I. Lefkovits, *Proteome analysis of activated murine B-lymphocytes*. Electrophoresis, 2000. **21**(17): p. 3730-9.
68. van Anken, E., et al., *Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 243-53.
69. Kim, D.R., *Proteomic changes during the B cell development*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **815**(1-2): p. 295-303.
70. Zan, H., et al., *AID-dependent generation of resected double-strand DNA breaks and recruitment of Rad52/Rad51 in somatic hypermutation*. Immunity, 2003. **18**(6): p. 727-38.
71. Kaufman, P.D., et al., *The p150 and p60 subunits of chromatin assembly factor I: a molecular link between newly synthesized histones and DNA replication*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1105-14.
72. Saeki, K., et al., *Identification of mammalian TOM22 as a subunit of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 31996-2002.
73. Kawasaki, H., et al., *ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 195-200.
74. Greenbaum, S. and Y. Zhuang, *Regulation of early lymphocyte development by E2A family proteins*. Semin Immunol, 2002. **14**(6): p. 405-14.

75. Holmes, M.L., C. Pridans, and S.L. Nutt, *The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(1): p. 47-53.
76. Anderson, S.J., S.D. Levin, and R.M. Perlmutter, *Protein tyrosine kinase p56lck controls allelic exclusion of T-cell receptor beta-chain genes*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 552-4.
77. Hoffmann, R., et al., *Changes in gene expression profiles in developing B cells of murine bone marrow*. Genome Res, 2002. **12**(1): p. 98-111.
78. Boyd, R.L., H.A. Ward, and H.K. Muller, *Bursal and thymic reticular epithelial cells in the chicken: induction of B- and T-lymphocyte differentiation by in vitro monolayer cultures*. J Reticuloendothel Soc, 1983. **34**(5): p. 383-93.
79. McCarthy, F.M., et al., *Modeling a whole organ using proteomics: the avian bursa of Fabricius*. Proteomics, 2006. **6**(9): p. 2759-71.
80. McCarthy, F.M., et al., *Differential detergent fractionation for non-electrophoretic eukaryote cell proteomics*. J Proteome Res, 2005. **4**(2): p. 316-24.
81. Funk, P.E., et al., *The avian chB6 alloantigen induces apoptosis in DT40 B cells*. Cell Immunol, 2003. **226**(2): p. 95-104.
82. Eguchi, Y., D.L. Ewert, and Y. Tsujimoto, *Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal organs in adult and embryo*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(16): p. 4187-92.
83. Ricci, A., et al., *Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the pigeon bursa of Fabricius: a radioligand binding and autoradiographic study*. J Neuroimmunol, 1996. **66**(1-2): p. 23-8.
84. Brink, P.R., et al., *Cholinergic modulation of immunoglobulin secretion from avian plasma cells: the role of calcium*. J Neuroimmunol, 1994. **51**(2): p. 113-21.
85. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
86. Masteller, E.L., et al., *Expression of sialyl Lewis(x) and Lewis(x) defines distinct stages of chicken B cell maturation*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5550-6.
87. Abbaszade, I., et al., *Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23443-50.
88. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
89. Old, W.M., et al., *Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by*

- shotgun proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1487-502.
90. Zhou, S., et al., *A quantitative investigation into the losses of proteins at different stages of a two-dimensional gel electrophoresis procedure*. Proteomics, 2005. **5**(11): p. 2739-47.
  91. Timms, J.F. and R. Cramer, *Difference gel electrophoresis*. Proteomics, 2008. **8**(23-24): p. 4886-97.
  92. Minden, J.S., et al., *Difference gel electrophoresis*. Electrophoresis, 2009. **30 Suppl 1**: p. S156-61.
  93. Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. Electrophoresis, 1997. **18**(11): p. 2071-7.
  94. Alban, A., et al., *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*. Proteomics, 2003. **3**(1): p. 36-44.
  95. Lucitt, M.B., et al., *Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(5): p. 981-94.
  96. Kondo, T., et al., *Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool*. Proteomics, 2003. **3**(9): p. 1758-66.
  97. Issaq, H.J. and T.D. Veenstra, *The role of electrophoresis in disease biomarker discovery*. Electrophoresis, 2007. **28**(12): p. 1980-8.
  98. Kernek, F., et al., *Changes in the mitochondrial proteome from mouse hearts deficient in creatine kinase*. Physiol Genomics, 2001. **6**(2): p. 117-28.
  99. Viswanathan, S., M. Unlu, and J.S. Minden, *Two-dimensional difference gel electrophoresis*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1351-8.
  100. Goodlett, D.R., et al., *Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001. **15**(14): p. 1214-21.
  101. Graumann, J., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and proteome quantitation of mouse embryonic stem cells to a depth of 5,111 proteins*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(4): p. 672-83.
  102. Kohlbacher, O., et al., *TOPP--the OpenMS proteomics pipeline*. Bioinformatics, 2007. **23**(2): p. e191-7.
  103. Chelius, D. and P.V. Bondarenko, *Quantitative profiling of proteins in complex*

- mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry*. J Proteome Res, 2002. **1**(4): p. 317-23.
104. Liu, H., R.G. Sadygov, and J.R. Yates, 3rd, *A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics*. Anal Chem, 2004. **76**(14): p. 4193-201.
105. Washburn, M.P., D. Wolters, and J.R. Yates, 3rd, *Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(3): p. 242-7.
106. Podwojski, K., et al., *Peek a peak: a glance at statistics for quantitative label-free proteomics*. Expert Rev Proteomics, 2010. **7**(2): p. 249-61.
107. Nesvizhskii, A.I. and R. Aebersold, *Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(10): p. 1419-40.
108. Cordwell, S.J. and T.E. Thingholm, *Technologies for plasma membrane proteomics*. Proteomics, 2010. **10**(4): p. 611-27.
109. Stasyk, T. and L.A. Huber, *Zooming in: fractionation strategies in proteomics*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 3704-16.
110. Cao, R., et al., *Integration of a two-phase partition method into proteomics research on rat liver plasma membrane proteins*. J Proteome Res, 2006. **5**(3): p. 634-42.
111. Bordier, C., *Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution*. J Biol Chem, 1981. **256**(4): p. 1604-7.
112. Zhang, L., et al., *Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins*. Proteomics, 2005. **5**(17): p. 4510-24.
113. Fujiki, Y., et al., *Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum*. J Cell Biol, 1982. **93**(1): p. 97-102.
114. Weerasekera, R., et al., *Interactome and interface protocol (2IP): a novel strategy for high sensitivity topology mapping of protein complexes*. Proteomics, 2007. **7**(21): p. 3835-52.
115. Tjalsma, H., et al., *Shedding & shaving: disclosure of proteomic expressions on a bacterial face*. Proteomics, 2008. **8**(7): p. 1415-28.
116. Ghosh, D., R.C. Beavis, and J.A. Wilkins, *The identification and characterization of membranome components*. J Proteome Res, 2008. **7**(4): p. 1572-83.
117. Karp, N.A., et al., *Comparison of DIGE and post-stained gel electrophoresis with both traditional and SameSpots analysis for quantitative proteomics*. Proteomics, 2008. **8**(5):

- p. 948-60.
118. Krogh, M., et al., *Analysis of DIGE data using a linear mixed model allowing for protein-specific dye effects*. Proteomics, 2007. **7**(23): p. 4235-44.
  119. Karp, N.A., et al., *Experimental and statistical considerations to avoid false conclusions in proteomics studies using differential in-gel electrophoresis*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(8): p. 1354-64.
  120. Geiger, B., et al., *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 793-805.
  121. Janmey, P.A. and D.A. Weitz, *Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(7): p. 364-70.
  122. Mierke, C.T., *The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells*. Cell Biochem Biophys, 2009. **53**(3): p. 115-26.
  123. Bakolitsa, C., et al., *Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion*. Nature, 2004. **430**(6999): p. 583-6.
  124. Goldmann, W.H., et al., *Motility of vinculin-deficient F9 embryonic carcinoma cells analyzed by video, laser confocal, and reflection interference contrast microscopy*. Exp Cell Res, 1995. **221**(2): p. 311-9.
  125. Mierke, C.T., et al., *Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain*. Biophys J, 2008. **94**(2): p. 661-70.
  126. Mierke, C.T., et al., *Contractile forces in tumor cell migration*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(8-9): p. 669-76.
  127. Yin, H.L., et al., *Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin*. J Biol Chem, 1984. **259**(8): p. 5271-6.
  128. Vouyiouklis, D.A. and P.J. Brophy, *A novel gelsolin isoform expressed by oligodendrocytes in the central nervous system*. J Neurochem, 1997. **69**(3): p. 995-1005.
  129. Sun, H.Q., et al., *Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33179-82.
  130. Choe, H., et al., *The calcium activation of gelsolin: insights from the 3A structure of the G4-G6/actin complex*. J Mol Biol, 2002. **324**(4): p. 691-702.
  131. Lamb, J.A., et al., *Modulation of gelsolin function. Activation at low pH overrides Ca<sup>2+</sup> requirement*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8999-9004.
  132. Liepina, I., et al., *Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a*



- lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Biopolymers, 2003. **71**(1): p. 49-70.
133. Kothakota, S., et al., *Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis*. Science, 1997. **278**(5336): p. 294-8.
134. Silacci, P., et al., *Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2614-23.
135. Cunningham, C.C., T.P. Stossel, and D.J. Kwiatkowski, *Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin*. Science, 1991. **251**(4998): p. 1233-6.
136. Chellaiah, M., et al., *Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength*. J Cell Biol, 2000. **148**(4): p. 665-78.
137. Lu, M., et al., *Delayed retraction of filopodia in gelsolin null mice*. J Cell Biol, 1997. **138**(6): p. 1279-87.
138. Niederreither, K. and P. Dolle, *Retinoic acid in development: towards an integrated view*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(7): p. 541-53.
139. Moro, J.R., M. Iwata, and U.H. von Andriano, *Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 685-98.
140. van de Pavert, S.A. and R.E. Mebius, *New insights into the development of lymphoid tissues*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(9): p. 664-74.
141. Schug, T.T., et al., *Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors*. Cell, 2007. **129**(4): p. 723-33.
142. Niederreither, K., et al., *Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse*. Mech Dev, 2002. **110**(1-2): p. 165-71.
143. Mora, J.R., et al., *Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells*. Science, 2006. **314**(5802): p. 1157-60.
144. van de Pavert, S.A., et al., *Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation*. Nat Immunol, 2009. **10**(11): p. 1193-9.
145. Veiga-Fernandes, H., et al., *Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 547-51.
146. Berggren, K., et al., *Expression and regulation of the retinoic acid synthetic enzyme RALDH-2 in the embryonic chicken wing*. Dev Dyn, 2001. **222**(1): p. 1-16.

- 
147. Ji, S.J., et al., *Mesodermal and neuronal retinoids regulate the induction and maintenance of limb innervating spinal motor neurons*. Dev Biol, 2006. **297**(1): p. 249-61.
148. Sockanathan, S. and T.M. Jessell, *Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons*. Cell, 1998. **94**(4): p. 503-14.

## **10. ANHANG**

### **A) Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4, Material und Methoden integriert.

- 1 Agentur für Rohstoffe, Hohenzell
- 2 Amersham Biosciences, Freiburg
- 3 AppliChem, Darmstadt
- 4 Applied Biosystems, Darmstadt
- 5 Biochrom, Berlin
- 6 Fluka, Buchs, Schweiz
- 7 GE Healthcare, Freiburg
- 8 Merck, Darmstadt
- 9 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
- 10 Pierce Biotechnology, Rockford (IL), USA
- 11 Promega, Mannheim
- 12 Ratiopharm, Ulm
- 13 Riedel-de Haën, Seelze
- 14 Roth, Karlsruhe
- 15 Serva, Heidelberg
- 16 Sigma, Deisenhofen
- 17 Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA
- 18 Uptima / Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich
- 19 VWR International GmbH, Ismaning

**B) Verbrauchsmaterialien**

<b>Produkt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellerfirma</b>
96-Lochplatten für Peptid-lösungen aus 2D-Gelspots	DigestPro MS 96 well collection plates	Intavis, Köln
96-Lochplatten für Verdau von 2D-Gelspots	DigestPro MS 96 well reaction plates	Intavis, Köln
Aluminiumfolie	Alu-Folie	Roth, Karlsruhe
C18-Trappingsäule für LC	C18 PepMap100	LC Packings Dionex, Idstein
C18-Trennsäule für LC	C18 PepMap100	LC Packings Dionex, Idstein
C18-Trennsäule für LC	Reposil-Pur-C18-AQ	Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen
Elektrospray-Nadeln für MS	Distal coated Silica Tips	New Objectiv, Woburn (MA), USA
FACS-Messröhrchen, 5ml	Flow Cytometry Röhren	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Filterpapier	Whatman Filterpapier	Whatman / Schleicher & Schuell, Dassel
IPG-Streifen für IEF	Immobiline DryStrips, pH 4-7, 24cm	GE Healthcare, Freiburg
Kanülen, 0,45mm x 25mm, braun	Sterican Einmal-Injektionskanülen	B.Braun, Melsungen
Klarsichtfolie	Saran	Dow, Schwalbach
LC-Glas-Probenröhrchen	Glass vial, 1,5ml	Amersham Biosciences, Freiburg
MACS Trennsäule	MACS Separation Column LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MALDI-Target	Opti-TOF 384 Well insert	Applied Biosystems, Darmstadt
Metallpaste	pol-Metallpflege	Reckitt Benckiser, Mannheim

Öl für IEF	DryStrip Cover Fluid	GE Healthcare, Freiburg
Pipettenspitzen mit chromatographischem C18-Material	Zip Tips $\mu$ -C18	Millipore, Schwalbach
Proben-Cups (0,5ml, 1,5ml und 2ml)	Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Köln
Proben-Cups für IEF	IPGphor Sample cups	GE Healthcare, Freiburg
Probenröhrchen 2ml mit Drehverschluss	Mikroröhre 0.5ml mit Verschuß	Sarstedt, Nürnbrecht-Rommelsdorf
Probenröhrchen für "DigestPro MS"-Roboter	DigestPro MS reagent tubes	Intavis, Köln
Probenröhrchen mit Keramikkügelchen (1,4 mm Durchmesser) 0,5ml und 2ml	Precellys Soft tissue homogenizing CK14	PEQLAB, Erlangen
Probenröhrchen, 15ml und 50ml	Falcon-Röhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Spritzen, 10ml	Omnifix 10ml	B.Braun, Melsungen
Spritzen, 5ml	Injekt 5ml	B.Braun, Melsungen
Sterile Pipettenspitzen (0,5 – 10 $\mu$ l)	DIAMOND 10 $\mu$ l	Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich
Sterile Pipettenspitzen (2 – 200 $\mu$ l)	PLASTIBRAND 200 $\mu$ l	Brand, Wertheim
Sterile Pipettenspitzen (50 – 1000 $\mu$ l)	PLASTIBRAND 1000 $\mu$ l	Brand, Wertheim

**C) Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellerfirma</b>
2D-Elektrophorese-Gießkammer	Ettan DALTwelve gel caster	GE Healthcare, Freiburg
2D-Elektrophorese-Laufkammer	Ettan DALTsix electrophoresis unit	GE Healthcare, Freiburg
2D-Gelkassetten-Glasplatten	Gel Casting Cassettes, 1mm	GE Healthcare, Freiburg
2D-Gelkassetten-Plastik-Dummies	Blank Cassette Inserts	GE Healthcare, Freiburg
Binokular	Olympus Tokio 291418	Olympus, Japan, über Microoptik München
Brutschrank für Verdau	Modell 400	Memmert, Schwabach
Durchflusszytometer	FACSCALIBUR	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophorese-Einheit	Mini-PROTEAN 3	BioRad, München
Feinwaage	Sartorius Basic Plus	Sartorius, Göttingen
Feinwaage	AE100	Mettler-Toledo, Giessen
Fluoreszenz-Scanner	Typhoon 9400	GE Healthcare, Freiburg
Gefrierschrank	HFU 686 Top (-80°C)	Heraeus, Hanau
Gewebehomogenisator	Precellys 24	PEQLAB, Erlangen
Isoelektrische Fokussierungs-Einheit	IPGphor	Pharmacia Biotech, Freiburg
Kühlschrank (+4°C)	Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Magnet für MACS	Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	MR 2000	Heidolph, Schwabach

Massenspektrometer I	LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific, Dreieich
Massenspektrometer II	Finnigan LTQ	Thermo Scientific, Dreieich
Massenspektrometer III	4800 MALDI TOF/TOF Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Mikroskop	Leica DMR	Leica, Bensheim
Mikrowelle	(Bezeichnung fehlt)	Panasonic, Hamburg
Mikrozentrifuge (12er)	EBA 3S	Hettich, Tuttlingen
Mikrozentrifuge (24er)	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Köln
nano-HPLC I	Ettan MDLC	Amersham Biosciences, Freiburg
nano-HPLC II	nano LC ultra	Eksigent Technologies über Axel Semrau, Sprockhövel
pH-Meter	761 Calimatic	Knick, Berlin
Pick-Roboter	PROTEINEER spII	Bruker Daltonics, Bremen
Plattenphotometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Power-Supply für 1D-Gele	Power Pac Basic	BioRad, München
Power-Supply für 2D-Gele	EPS 3501 XL	Amersham Biosciences, Freiburg
Rehydratisierungskassette	Immobiline Dry Strip Reswelling Tray	GE Healthcare, Freiburg
Roboter für Proteinverdau und Probenvorbereitung für MALDI	DigestPro MS	Intavis, Köln
Scanner	Perfection V750 Pro	Epson

Schüttler	Certomat U	B.Braun, Melsungen
Sterile Werkbank	LaminAir	Heraeus, Hanau
Thermostat-Schüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf, Köln
Thermostat zur Kühlung der 2D-Gele bei Elektrophorese	(Bezeichnung fehlt)	Eppendorf, Köln
Tiefkühlschrank (-20°C)	Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Ultraschallreiniger	Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
Ultraschallreiniger	EMMI 30 HC	EMAG, Mörfelden-Walldorf
Vakuumzentrifuge	Vacuum Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Vortexer	Vortex Genie 2	Bachhofer, Reutlingen
Waage	Sartorius 2357	Sartorius, Göttingen
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge I	GS-15R Centrifuge	Beckman, Krefeld
Zentrifuge II	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge III	GS-6KR Centrifuge	Beckman, Krefeld



**D) Software**

<b>Gerätespezifische Software</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellerfirma</b>
4800 MALDI TOF/TOF Analyzer	4000 series explorer, GPS explorer	Applied Biosystems, Darmstadt
DigestPro MS	DigestPro MS	Intavis, Köln
Ettan MDLC	UNICORN 5.01	Amersham Biosciences, Freiburg
FACSCALIBUR	CellQuest, WinMDI 2.8	Becton Dickinson, Heidelberg
Finnigan LTQ	Xcalibur (inc. Dynamic exclusion software)	Thermo Scientific, Dreieich
LTQ Orbitrap XL	Xcalibur (inc. Dynamic exclusion software)	Thermo Scientific, Dreieich
nano LC ultra	Eksigent	Eksigent Technologies über Axel Semrau, Sprockhövel
PROTEINEER spII	SPControl 3.1	Bruker Daltonics, Bremen
Sunrise Remote-Plattenphotometer	XRead Plus	Tecan, Crailsheim
Typhoon 9400	Typhoon Scanner Control, ImageQuant 5.2	GE Healthcare, Freiburg

<b>Sonstige Software</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellerfirma/Verwalter</b>
Analyse-Software für 2D-DIGE-Gele	DeCyder 7.0	GE Healthcare, Freiburg
Analyse-Software für proteomische Daten	Scaffold 2.6	Proteome Software, Portland (OR), USA
Gene Ontology	UniProt Gene Ontology / UniProt KB	European Bioinformatics Institute (EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) und Protein Information Resource (PIR)
Pathway-Analysen	DAVID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Bethesda (MD), USA
Protein-Suchmaschine	NCBI-BlastP	European Bioinformatics Institute, Cambridge, Großbritannien
Protein-Suchmaschine	UniProt Search/UniProt KB	European Bioinformatics Institute (EBI), Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) und Protein Information Resource (PIR)
Suchmaschine für massenspektrometrische Daten	MASCOT Search	Matrix Science, Boston (MA), USA

## 11. DANKSAGUNG

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers für das sowohl technisch reizvolle als auch fachlich interessante Dissertationsthema, sowie die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner stets freundlichen und hervorragenden wissenschaftliche Betreuung in diesem Labor durchzuführen. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Sonja Härtle für die ausgezeichnete fachliche Betreuung und die kollegiale wissenschaftliche Zusammenarbeit in den letzten zweieinhalb Jahren bedanken. Ihnen beiden ist das Gelingen dieser Arbeit durch stete fachliche Anregung und engen wissenschaftlichen Austausch zu verdanken.

Prof. Dr. Stangassinger danke ich für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Bei Dr. Georg Arnold und Dr. Thomas Fröhlich möchte ich mich für die enge wissenschaftliche Kooperation und die hervorragende Betreuung der technischen Seite meines Projektes bedanken, ohne die dessen Gelingen nicht möglich gewesen wäre.

Für ihre stete Hilfsbereitschaft und die exzellente technische Unterstützung möchte ich mich bei Marina Kohn, Ingrid Riehl, Beatrice Schaerer und Miwako Kösters bedanken.

Auch bei den Doktoranden unserer Arbeitsgruppe und allen anderen Doktoranden des Instituts möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Für die Betreuung der Tiere bedanke ich mich bei Hedi Opitz, Fritz Meggendorfer und Thomas Hoschka.

Frau Hignet, Frau Crass, Frau Mayer, Frau Summer und Frau Ohl gilt mein Dank für ihre Unterstützung in allen Verwaltungsangelegenheiten.

Bei Myriam Demant möchte ich mich für die Einarbeitung in die Technik der 2D-Gelelektrophorese, die äußerst kollegiale Zusammenarbeit der letzten eineinhalb Jahre und den fortwährenden wissenschaftlichen Austausch, sowie die daraus entstandene tiefe Freundschaft bedanken.

Bei Stefan, Ute, Kathi, Jana und Marion möchte ich mich an dieser Stelle für die vielen „Sing Star“-Abende, Grillen auf der Terrasse, Nikoläuse, Kürbisse und unersetzlichen Beistand in allen Lebenslagen bedanken.

Meiner Familie danke ich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Verständnis während der gesamten Studien- und Promotionszeit sowie für ihre Freude über das Gelingen dieser

Arbeit. Besonderer Dank gebührt meiner Schwester Eva als Ansprechpartnerin in allen Lebensfragen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ute Breithaupt danke ich für die Aufnahme in der „Schreib-WG“ und dafür, dass wir diesen Weg gemeinsam gegangen sind.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei Thomas Eichner bedanken, der mich während der ganzen Zeit unterstützt, aufgemuntert und motiviert hat.